T H E S E S

PRESENTEES A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

POUR

OBTENIR LE GRADE

DE DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Marianne SEMMEL

PREMIERE THESE

1ère partie : Etude des complexes entre les colorants basiques et le RNA

2ème partie : L'absorption et la fixation intracellulaire des colorants basiques par les cellules animales vivantes.

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenue le 22 avril 1967 devant la Commission d'Examen

Mrs L. HIRTH	Président
J.P. EBEL	Examinateurs
M. DAUNE	
J. HUPPERT	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552704_0013

T H E S E S

PRESENTEES A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

POUR

OBTENIR LE GRADE

DE DOCTEUR-ES-SCIENCES

par

MARIANNE SEMMEL

PREMIERE THESE

1ère partie : Etude des complexes entre les colorants basiques et le RNA

2ème partie : L'absorption et la fixation intracellulaire des colorants basiques par les cellules animales vivantes.

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 22 avril 1967 devant la Commission d'Examen

Mrs L. HIRTH — Président

J.P. EBEL
M. DAUNE
J. HUPPERT — Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ce travail a été effectué à l' Institut Gustave Roussy à Villejuif.

Monsieur le Professeur DENOIX a mis à notre disposition toutes les facilités de travail.

Monsieur le Docteur Joseph HUPPERT a guidé nos expériences pendant des années, et a discuté avec une inlassable patience les résultats.

Monsieur le Professeur Michel DAUNE a dirigé la partie physico-chimique de ce travail, et nous a aidés dans l'interprétation des résultats expérimentaux, tâche rendue particulièrement difficile par la distance géographique. Je les prie de trouver ma profonde gratitude.

Je remercie Monsieur P. LAZAR sans lequel le modèle mathématique que nous présentons n'aurait jamais vu le jour.

Je remercie également Monsieur le Docteur F. ZAJDELA dont les conseils nous ont été précieux dans le domaine de la cytologie, Monsieur le Docteur F. CHAUVEAU qui nous a conseillé dans les expériences de fractionnement des cellules, Madame le Docteur L. HAREL, dont les conseils nous ont été précieux, Madame le Docteur L. BLUM-EMERIQUE qui a surveillé la rédaction, Mademoiselle de TRAVERSAY qui a assuré les ultracentrifugations analytiques, Monsieur J. POUYET qui a mis à notre disposition les plans du porte-cuve chauffant.

J'ai plaisir à évoquer enfin, l'ambiance particulièrement sympathique du service de Biologie Moléculaire de l'Institut Gustave Roussy.

UNIVERSITE DE STRASBOURG
FACULTE DES SCIENCES

Doyen : Professeur J.H. VIVIEN
Doyens Honoraires : A. DANJON, A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.J. MARESQUELLE, G. MILLOT,
Professeurs Honoraires : P. de BEAUCHAMP, L. BOISSELET, H. CARTAN G. CERF, C. CHABAUTY, A. CHRETIEN, A. DANJON, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M.FRECHET, H. GAULT, Mle S. GILLET, A. HEE, R. ROCART, A. KIRRMANN, G.MEMEE, P. L'HERITIER, H. VILLAT, H. WEISS, Et. WOLFF, J. YVON.
Maître de Conférences Honoraires : R. WEIL

Professeurs :

H.J. MARESQUELLE	T	Biologie Végétale
A. ROUSSEL	T	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H. FORESTIER	T	Chimie générale
J. ROTHE	T	Physique du Globe
P. LACROUTE	T	Astronomie
J.H. VIVIEN	T	Zoologie et Embryologie expérimentale
A. MAILLARD	T	Physicochimie du Pétrole
S. GORODETZKY	T	Physique générale et physique nucléaire
L. SACKMANN	T	Mécanique des Fluides
J. BYE	T	Chimie Physique
R. LOMBARD	T	Chimie organique

R. WEY ..... T.T.P Chimie
Mme D. MAGNAC ..... T.T.P Physique
M. DAUNE ..... P.S.C Physique
J.P. ADLOFF ..... T.T.P Chimie nucléaire
D. BERNARD ..... T.T.P Méthodes mathématiques de la physique
M. ZELMAN ..... T.T.P Mathématiques
E. DANIEL ..... T Physique expérimentale
P. CHEVALLIER ..... P.S.C Physique
J. GREMILLARD ..... T.T.P Mathématiques
P. CARTIER ..... T Mathématiques M.P.C.
G. WEBB ..... T Topologie
F. NORGUET ..... T Analyse supérieure
R. CHAUVIN ..... T Psychophysiologie
J. MUCKER ..... P.S.C Physique
Mme M. GRINI ..... P.S.C Chimie
G. PERNY ..... P.S.C Physique
R. BARO ..... P.S.C Physique
H. DURANTON ..... P.S.C Botanique
R. WEISS ..... T.T.P Chimie
P. FEDERLIN ..... T.T.P Chimie
J. LERAY ..... P.S.C Physique
J.P. SCHWING ..... P.S.C Chimie
M. SIESKIND ..... P.S.C Physique
G. MONSONEGO ..... P.S.C Physique mathématique
P. GABRIEL ..... T.T.P Mathématiques
C. WIPPLER ..... T Physicochimie des Hauts Polymères Industriels
P.A. MEYER ..... T.T.P Mathématiques
G. WEILL ..... P.S.C Physique
J.M. BLOCH ..... T Chimie
A. CLAUSS ..... P.S.C Chimie
R. OMNES ..... P.S.C Physique théorique
E. FOLLENIUS ..... P.S.C Zoologie
J. LUCAS ..... P.S.C Géologie

Mle M. PEREY	T	Chimie Nucléaire
S. GOLDSZTAUB	T	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY	T	Biologie générale
H. BENOIT	T	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER	T	Physique générale et physique corpusculaire
G. MILLOT	T	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET .....T.T.P		Physique du Globe
H. JAUCIER .....T.T.P		Minéralogie
R. ROHMER	T	Chimie minérale
Mle A. GAGNIEU .....T.T.P		Botanique
S. NIKITINE	T	Physique générale
F. SPUTINSKY	T	Physiologie générale
B. KURTZ .....T.T.P		Chimie biologique
J. BRENET	T	Electrochimie
G. OURISSON .....T.T.P		Chimie
A. COCHE .....T.T.P		Physique nucléaire
R. CERF	T	Physique générale
J. FRENKEL .....T.T.P		Mathématiques
P. TAGLANG	T	Physique
J.P. LONCHAMP .....T.T.P		Physique
A. DELUZARCHE .....T.T.P.		Chimie
J.B. DONNET .....T.T.P		Chimie Physique
R. ARMBRUSTER .....T.T.P		Physique
A. ROCHE .....T.T.P		Physique du Globe
L. HIRTH	T	Microbiologie
A. SIGOT .....P.S.C.		Zoologie
J. COGNE .....T.T.P.		Géologie
A. FUCHS	T	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN .....T.T.P		Physique
P. MIALHE .....T.T.P		Physiologie animale
J.P. EBEL	T	Chimie biologique
J. PARROD .....T.T.P		Chimie

Professeurs associés :

S.R. DE GROOT ..... Physique nucléaire
K. VESELY ..... Physicochimie macromoléculaire

Maîtres de Conférences :

H. DANAN ..... Physique
Mme WINTER Chr ..... Physique
J.P. EBERHART ..... Minéralogie
Mme D. CAGNIANT ..... Chimie
X. FERNIQUE ..... Mathématiques
J. STREITH ..... Chimie
J. WEIL ..... Chimie biologique
E. GAUTIER ..... Physique propédeutique
G. CUTTER ..... Physique électronique
D. FOATA ..... Mathématiques
J.L. VERDIER ..... Mathématiques
J.M. LEHN ..... Chimie
Cl. ROBERT ..... Physique

Maîtres de Conférences associés :

V. AVANISSIAN ..... Mathématiques
R.A. MASSY WESTROPP ..... Chimie organique

Secrétaire : G. SAINT-PE

P R E M I E R E P A R T I E

ETUDE DES COMPLEXES DE COLORANTS BASIQUES AVEC LE RNA

INTRODUCTION

De nombreux colorants, dérivés de l'acridine, sont utilisés depuis longtemps en histologie en qualité de colorants spécifiques des acides nucléiques (1). Du fait que ces colorants sont mutagènes, (2 - 6), leur interaction avec les acides nucléiques est particulièrement intéressante. Dans la mesure où elle est la même in vivo et in vitro, son étude ouvre la voie à une interprétation de l'action mutagène en termes physico-chimiques.

Par ailleurs, ils sont capables, ainsi que certains antibiotiques d'inhiber la synthèse des acides nucléiques (7). Enfin, plusieurs de ces colorants jouent le rôle de photosensibilisateurs et, une fois fixés sur le support macromoléculaire, provoquent des modifications chimiques ou des coupures de la molécule par action photodynamique (8 - 13). Aussi s'explique-t'on le grand nombre de travaux consacrés à l'étude de l'interaction du DNA avec ces corps . Les complexes formés se classent en deux grandes catégories que nous appellerons respectivement complexe I et complexe II.

Le complexe I qui se forme en présence d'un excès d'acide nucléique, se manifeste en spectrophotométrie par un déplacement du maximum d'absorption du colorant à des longueurs d'onde plus longues, (effet bathochrome ou métachromasie négative ou "red shift") et une hypochromicité dans l' U.V. Il est peu sensible à la force ionique. En général, un tel complexe se forme par intercalation de la molécule de colorant entre les plateaux des bases, avec détorsion locale de la double hélice. L'énergie de liaison est de 7 à 8 Kcal/mole environ. Elle correspond au couplage des dipôles induits et permanents des bases et des colorants. Le nombre des sites

et leur spécificité est lié à la nature des bases puriques et pyrimidiques entre lesquelles le colorant est intercalé (14 - 22).

Le complexe II se manifeste en spectrophotométrie par l'apparition d'un épaulement ou d'une bande à des longueurs d'onde plus courtes (effet hypsochrome ou métachromasie positive ou "blue shift"). Il s'agit d'un complexe extérieur, avec fixation du colorant basique sur les groupements phosphate négatifs de la chaîne phosphodiester. La stabilité de ce complexe est très sensible à la force ionique. Le voisinage des molécules de colorant permet des couplages de Van der Waals entre elles. Une intéraction du type excitonique s'établit, créant le spectre caractéristique qui peut aussi s'observer pour des concentrations élevées du colorant seul (23 - 25). L'énergie de liaison est plus faible, de 2 - 3 Kcal/mol environ. La stoéchiométrie et la stabilité du complexe vont dépendre de la flexibilité de la chaîne du polymère en même temps que de la nature plus ou moins hydrophobe des groupements portés par la molécule du colorant. En regard de ces nombreuses recherches sur le DNA, peu de travaux ont été faits dans le cas des RNA (26 - 27). Un travail antérieur (28) avait mis en évidence le complexe I formé entre le RNA d'une part et les trois colorants pyronine, bleu de toluidine et acridine orange. Nous avions montré que la formation du complexe dépend du rapport molaire RNA/colorant et du degré de structuration du RNA. Ces premières observations nous ont encouragé à faire une étude physico-chimique approfondie du complexe I. Nous avons déterminé le nombre de sites n, la constante d'association intrinsèque k et la variation d'enthalpie libre ΔG accompagnant la fixation, dans le cas du RNA ribosomal; des quatre colorants : proflavine (PF), pyronine (PY), bleu de toluidine (BT) et acridine orange (AO). Ces colorants présentent des analogies de structure comme

l'indiquent leurs formules (fig. 1). Nous avons, ensuite, pour chaque colorant, cherché l'influence sur n des facteurs suivants

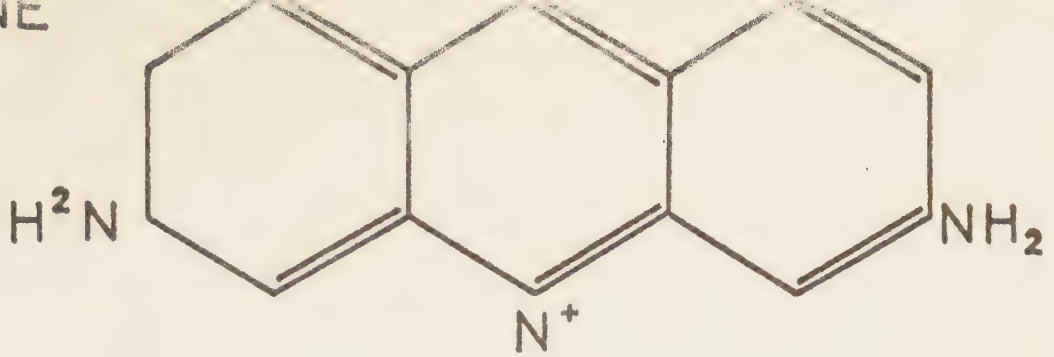
a) Variation du pH entre 5 et 8 ; dans ce domaine, l'ionisation des groupes phosphates et des bases est inchangée. Seuls les colorants utilisés, qui sont tous des indicateurs de pH, pouvaient être susceptibles de modifier leur charge, bien que leur spectre d'absorption ne change pas dans cet intervalle de pH.

b) Variation de la force ionique entre 0,01M et 0,2M ; dans le cas du DNA, le complexe I est légèrement sensible à la force ionique puisqu'une partie de ΔG est d'origine électrostatique (22). Par contre, on doit s'attendre à des changements considérables de la structure secondaire et tertiaire du RNA.

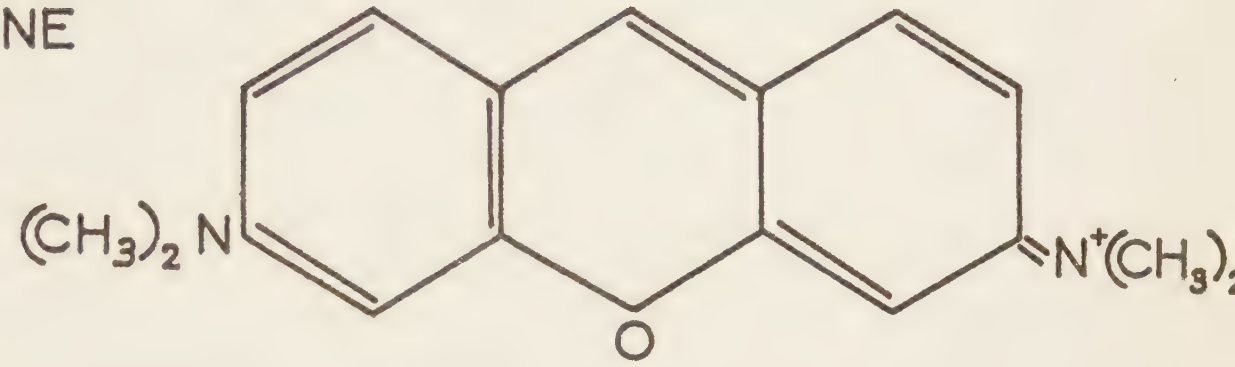
c) Remplacement du cation compensateur Na^+ par Li^+ Cs^+ NH_4^+ et Mg^{++} et compétition avec un cation lourd Ag^+ . Dans le cas des cations alcalins, seule l'énergie de liaison cation-phosphate change avec le cation (29 - 38). L'ion Mg^{++} , par contre, stabilise fortement la structure du RNA (30), sans doute, par formation de chélates internes entre deux phosphates, et peut, ainsi "fermer" certains sites du complexe I.

Enfin, l'hydratation du RNA varie suivant la nature du cation compensateur ce qui peut, par conséquent, influer l'insertion de molécules hydrophobes.

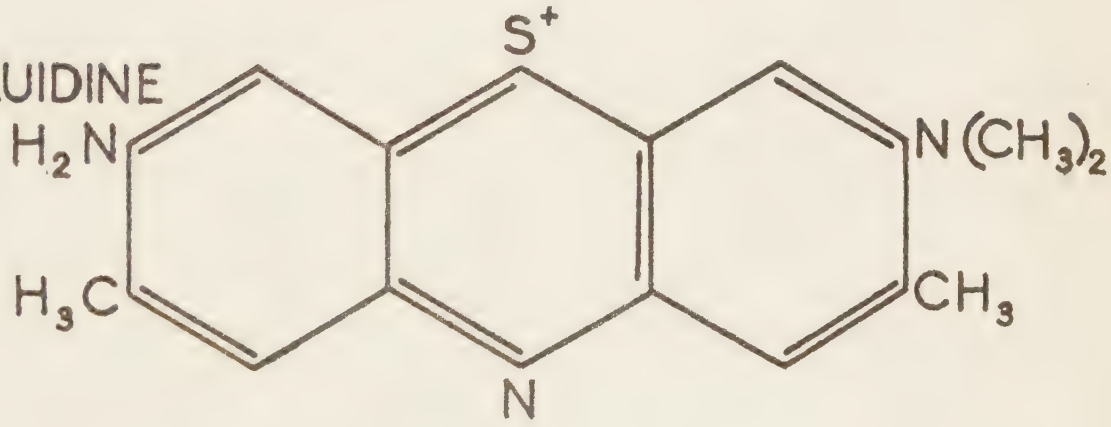
PROFLAVINE



PYRONINE



BLEU DE TOLUIDINE



ACRIDINE ORANGE

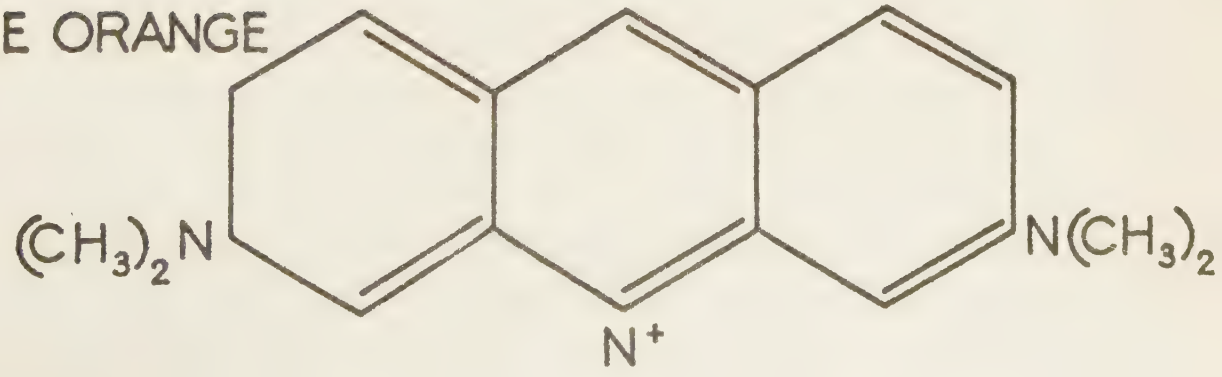


Figure 1. - Formule des colorants

MATERIEL

Py et BT provenaient de la Maison Fluka. Ils ont été purifiés par lavage au chloroforme jusqu'à ce que la phase chloroforme soit incolore. PF et AO ont été purifiés sur colonne selon la méthode décrite par CHAMBRON (31).

Le RNA a été extrait de cellules de Krebs II par le phénol. La phase aqueuse a été soumise pendant une heure à 37° à l'action de la pronase (Calbiochem) afin d'éliminer les protéines résiduelles, en particulier, la RNAse (32), et réextraits par le phénol. Le RNA ribosomal a été isolé par précipitation par le NaCl 2M à 0° suivie d'une dialyse contre du tampon 0,01M pH 7. Ce RNA contient deux fractions : le RNA ribosomal 1 a une constante de sédimentation de 28 (ramené à 20° dans l'eau) et contient 30 % de cytosine, 17 % d'adénine, 34 % de guanine et 17 % d'uracile. Cette fraction représente environ 65 % du RNA total. Le RNA ribosomal 2 a une constante de sédimentation de 18, contient 28 % de cytidine, 20 % d'adénine, 30 % de guanine et 21 % d'uridine. Il représente 35 % du RNA. Ces deux fractions ont été isolées par deux centrifugations successives en gradient de sucrose 5 - 20 % dans du NaCl 0,1M tampon phosphate pH 7 0,001M, suivies de dialyse et de précipitation par l'éthanol. Le précipité a été repris dans du tampon phosphate 0,01M pH 5 et dialysé contre du tampon pH 7 10^{-2}M. Après cette dialyse, les propriétés de sédimentation ont été vérifiées par centrifugation en gradient de sucrose. Les fractions se retrouvent dans des zones du gradient qui correspondent respectivement à une constante de sédimentation de 28 et de 18. D'après l'aspect des courbes, chaque fraction contient moins de 10 % de RNA correspondant à l'autre fraction. Le RNA reconstitué a été obtenu par un mélange de RNA 28S et de RNA 18S dans les

proportions 2/3 1/3.

Les polynucléotides de synthèse (acide polyadénylique, acide poly-uridylique, acide poly-cytidylique, acide poly-inosinique) provenaient de la Miles Company. Les mélanges ont été faits d'une part avec du poly-A et du poly-U dans un rapport molaire 1/1, qui forment à pH 7 et à une force ionique de 0,01M une double hélice avec une constante de sédimentation de 12 ; d'autre part, avec du poly-A et du poly-U dans un rapport molaire 1/2 qui forment dans ces conditions une triple hélice (33) qui sédimente avec une constante de 22. Le poly-C et le poly-I, mélangés dans un rapport molaire 1/1 forment une double hélice assez instable dont la constante de sédimentation est d'environ 8.

Les produits chimiques utilisés provenaient de chez Merck. Les cations étaient ajoutés sous forme des sels suivants phosphates mono et disodique, NaCl, LiCl, $(NH_4)_2SO_4$, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $AgNO_3$. Nous avons utilisé des tampons GOMORI (34) phosphate (pH 6,7,8) et acétate (pH 5). L'eau utilisée dans toutes les expériences était déminéralisée et bidistillée.

Les solutions de colorant étaient préparées dans l'eau et conservées à l'obscurité à la température du laboratoire. Les dilutions étaient faites au moment de l'expérience dans du tampon correspondant.

Le RNA et les polynucléotides ont été conservés à - 20° dans un tampon acétate pH 5 0,01M à une concentration de 1 mg/ml et dilués au moment de l'expérience. La concentration molaire en nucléotides des différents RNA utilisés a été calculée d'après un P.M. moyen du nucléotide de 340. La concentration du RNA a été déterminée par spectrophotométrie, 1 mg/ml de RNA correspondant à une D.O de 25 à une longueur d'onde de 260 mμ.

Les mélanges colorant-polymère ont été faits

directement dans les cuves spectrophotométriques : à une quantité fixe de polymère des quantités déterminées de colorant ont été ajoutées à l'aide d'une micropipette ; les mesures spectrophotométriques ont été faites immédiatement après le mélange des constituants.

La détermination des constantes de sédimentation a été faite avec une ultracentrifugeuse Spinco analytique E munie d'un dispositif UV. Les centrifugations en phase hétérogène ont été faites dans les rotors SW 39 ou SW 25 d'une ultracentrifugeuse Spinco préparative. On a utilisé pour les mesures spectrophotométriques, un spectrophotomètre Zeiss enregistreur modèle RPQ 20 A.

Pour l'établissement des courbes de fusion, nous nous sommes servi d'un porte-cuves, chauffé électriquement, mis au point par J. POUYET. La température a été mesurée à l'intérieur de la cuve à l'aide d'un couple.

Les valeurs de D.O obtenues expérimentalement ont été corrigées afin de tenir compte de l'augmentation du volume en fonction de la température.

METHODES

Pour déterminer la stoéchiométrie du complexe et l'énergie d'interaction, la méthode classique consiste à tracer des isothermes d'adsorption au moyen d'une série d'équilibres de dialyse.

Dans notre cas, cette méthode présente des sérieux inconvénients : certains colorants, notamment la pyronine et le bleu de toluidine se fixent préférentiellement sur la membrane du sac à dialyse et le rendent progressivement imperméable, de façon qu'un équilibre ne peut pas être atteint. D'autre part, le RNA est un matériel fragile, dont la structure ne résiste pas bien à des manipulations de longue durée. Pour ces raisons, nous avons abandonné cette technique, et nous avons utilisé concurremment deux procédés en apparence équivalents : l'un en phase hétérogène, en sédimentant totalement le RNA en présence de colorant (35), l'autre en phase homogène, par mesure de la densité optique du mélange RNA-colorant à une longueur d'onde déterminée.

Dans chaque cas, il s'agit de mesurer la fraction r de colorant fixée par nucléotide et la concentration A_o du colorant libre en équilibre avec le complexe.

Afin de déterminer le nombre de sites n et la constante d'association k nous avons choisi les expressions de SCATCHARD et de BJERRUM (41) dont nous présentons des exemples dans les figures 3 et 4.

Les deux expressions reposent sur un modèle d'intéraction macromolécules-ligand qui fait intervenir des séries de sites homogènes indépendants les uns des autres. L'équation générale de la formation des complexes est alors :

$$r = \sum_i \frac{k_i n_i A_o}{1 + k_i A_o}$$

ou r est le rapport du colorant lié/macromolécule, exprimé respectivement en moles de colorant et moles de nucléotide ; k la constante d'association n le nombre de sites, A_o, la concentration du colorant libre en moles, et où i désigne le nombre de séries de sites homogènes.

Quand on considère être en présence de 3 séries de sites par exemple, cette équation devient :

$$r = \frac{k_1 n_1 A_o}{1 + k_1 A_o} + \frac{k_2 n_2 A_o}{1 + k_2 A_o} + \frac{k_3 n_3 A_o}{1 + k_3 A_o}$$

L'expression de SCATCHARD consiste alors à porter les valeurs de r/A_o en fonction de r. L'équation théorique de l'isotherme est $r/A_o = k (n - r)$. Si, dans le graphique correspondant, les points expérimentaux s'alignent sur une droite, il est possible de déterminer k et n.
La pente de la droite = k, et n correspond au point où la droite coupe l'axe des abscisses.

Si n et k des différentes séries varient peu entre eux, on n'obtiendra pas une droite mais une courbe dont la concavité est tournée vers le haut. Si des différences importantes existent entre les sites, on obtiendra une série de droites, et, par conséquent, k_1 , k_2 etc ... et n_1 , n_2 etc ...

L'expression de BJERRUM consiste à porter r en fonction de log A_o. On obtient alors une courbe asymétrique en S qui présente un point d'inflexion et un palier horizontal. Le point d'inflexion correspond à

$$r = \frac{n}{2}$$

et log A_o = - log k, le palier horizontal à n. Evidemment, le même raisonnement s'applique que dans le cas précédent quand plusieurs groupes de sites sont présents, ni le point d'inflexion ni le palier horizontal ne seront bien définis ; on aura plusieurs courbes en S d'autant plus superposées que les différences entre les séries de sites seront faibles.

Ensuite, quand on connaît k, il est facile de calculer ΔG :

$$\Delta G = - RT \log k.$$

Nous montrons des exemples de courbes correspondants aux expressions de SCATCHARD et de BJERRUM dans les figures 3 et 4.

En phase hétérogène, A_o est mesuré directement par dosage spectrophotométrique du surnageant. Connaissant la quantité totale de colorant A_T, on en déduit A_b (colorant lié) = $A_T - A_o$ et par suite

$$r = \frac{A_b}{P}$$

P désignant la concentration en polynucléotide.

En phase homogène, la densité optique D.O correspond à la fois au colorant lié d'extinction molaire ε_b et au colorant libre d'extinction ε_o.

$$D.O = \varepsilon_o A_o + \varepsilon_b A_b$$

comme $$A_o = A_T - A_b$$

on en tire $$A_b = \frac{D.O - \varepsilon_o A_T}{\varepsilon_b - \varepsilon_o} \qquad (1)$$

A partir de A_b, on calcule r puis A_o. Lorsque l'on porte D.O en fonction de A_T, la courbe obtenue à une pente à l'origine qui est égale à ε_b.

Si la construction des isothermes paraît facile à partir de l' une ou de l'autre méthode, en fait, trois phénomènes viennent perturber les résultats.

1) La sédimentation du polynucléotide se produit en présence d'une concentration totale constante A_T du colorant puisque ce dernier ne sédimente pas. Au fur et à mesure que la concentration du polymère croît, il y a déplacement de l'équilibre d'adsorption et comme $A_T = A_o + rP$ est constant, on observe une diminution progressive de A_o. L'isotherme tracé sera déplacé vers les faibles valeurs de A_o et ne pourra être utilisé que pour déterminer la valeur limite n.

2) Un polynucléotide hétérogène et à chaîne flexible tel que le RNA, est capable de former simultanément le complexe I et le complexe II dans certaines conditions de concentration du colorant et de force ionique. En phase hétérogène, ces deux complexes sédimenteront et A_b correspondra au colorant lié dans les deux complexes à la fois. En force ionique élevée (0,1M), la formation du complexe 2, alors que celle du complexe I n'est pas finie, ne se produit pas pour des colorants tels que PF et Py qui ne s'associent pas en solution, aux concentrations étudiées. Ce n'est plus vrai pour des colorants s'associant facilement, tels que BT et AO. Il en résulte pour ces derniers une valeur de n systématiquement trop grande. En force ionique faible (10^{-2}M), il est impossible de mesurer n pour BT et AO et on obtient même pour PF et Py des valeurs fortement surestimées.

3) En phase homogène, le calcul de A_n n'est juste que si on peut de même négliger la formation simultanée du complexe II.

On peut déjà éliminer en partie cet effet en se plaçant à une longueur d'onde où sa contribution à la D.O est négligeable soit respectivement : 575 mμ pour Py, 482 mμ pour

PF, 680 mμ pour BT et 530 mμ pour AO. Cependant, même dans ce cas, si A_{b1} et A_{b2} désignent respectivement les quantités de colorant fixées sous forme de premier et de deuxième complexe, on a :

$$A_o = A_T - A_{b1} - A_{b2}$$

et

$$A_{b1} = \frac{D.O - \varepsilon_o A_T + \varepsilon_b A_{b2}}{\varepsilon_b - \varepsilon_o} \qquad (2)$$

L'application de la formule (1) conduit donc à des valeurs trop faibles de A_{b1} et, par suite, de r.

Dans le cas de PF et de Py, la formation du second complexe est négligeable tant que r est petit. Par contre, la formule 1 ne peut s'appliquer pour les complexes comprenant BT ou AO que dans des conditions expérimentales qui permettent de supprimer le deuxième complexe. En toute autre condition, A_{b1} doit être déterminé directement par mesure de la D.O aux longueurs d'onde appropriées. La quasi totalité du colorant est liée en complexe I ou en complexe 2 et la quantité de colorant libre est négligeable, tant que r est petit.

Par conséquent, nous n'avons déterminé les valeurs de n et de k à l'aide de la formule (1) pour PF et PY et pour BT et AO que dans les conditions expérimentales suivantes : à force ionique 0,1M et 0,2M et en présence de Mg^{++}, inhibiteur du second complexe. Les autres déterminations ont été faites par dosage direct de A_{b1} .

METHODES EMPLOYEES DANS LA DETERMINATION DES TEMPERATURES DE TRANSITION

Afin de déterminer les températures de transition, nous avons calculé l'augmentation de la D.O en pourcentage. Nous avons porté cette augmentation en ordonnée et la température en abscisse, et nous avons déduit la température de transition moyenne. Elle correspond à la température à laquelle la moitié de l'effet maximum est atteint. Quand les mesures sont faites aux longueurs d'onde correspondants au colorant elle désigne la température à laquelle la moitié du colorant est désorbé. Quand les mesures sont faites à 260 mμ, elle correspond à la température à laquelle la moitié des parties structurées est désorganisée. En comparant les températures de transition, du colorant absorbé en complexe 1, d'une part, et du polymère seul, d'autre part, l'écart $T'_m - T_m$ peut être mesuré. De tels écarts ont déjà été observés dans le cas des complexes entre le DNA et la PF et correspondent à un effet de stabilisation électrostatique (22). Il est donc possible d'apprécier la stabilisation locale dans le cas de chaque polymère.

D'autre part, on sait que la variation d'entropie qui accompagne l'intercalation et qui correspond au changement de configuration locale, est positive à 20° , mais peut devenir négative à 60° (22). La variation totale de l'énergie ΔG se compose de deux thermes, ΔH = variation d'enthalpie et ΔS, variation d'entropie.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Le terme entropique dépend outre de la configuration locale de la macromolécule, de son hydratation, qui, à son tour, dépend de la température de la force ionique et du colorant. Le terme enthalpique ne change pratiquement pas. La variation totale de l'énergie libre sera donc formée de deux

B VARIATION DU pH ET DE LA NATURE DES CATIONS

	n1 moyen x 10^{-3}	écart moyen x 10^{-3}	%
Py (8 exp.)	171	± 24	14
PF (8 exp.)	58	± 6	9,3
BT (8 exp.)	85	± 8	9,4
AO (7 exp.)	54	± 7	12,4
	n2 moyen x 10^{-3}	**écart moyen x 10^{-3}**	**%**
Py (8 exp.)	282	± 26	9,2
PF (8 exp.)	103	± 12	11,6
BT (8 exp.)	132	± 10	7,5
AO (7 exp.)	103	± 7	6,5

L'erreur moyenne est donc de l'ordre de 10 % en force ionique 10^{-2}M et en phase homogène, aussi bien pour les duplicatas que pour les expériences qui font varier le pH et les cations. En phase hétérogène et en force ionique élevée, il peut être nettement plus grand comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent.

2) Dans la détermination des températures de transition :

L'erreur expérimentale a été déterminée d'après des duplicatas. Elle est de ± 2° pour le RNA dont la transition s'étale sur plus de 50°, et de ± 1° pour les polynucléotides dont l'étendue de transition est moindre. Chaque expérience a été faite en double.

A) STOECHIOMETRIE ET CONSTANTE D'ASSOCIATION

Protocole expérimental

Les mesures de densité optique ont été faites avec des mélanges colorant-polymère, telles que nous les avons décrites dans le chapitre "Matériel". Nous avons calculé, à partir des valeurs de D.O, les valeurs de r et de A_o , comme nous l'avons décrit dans le chapitre "Méthodes" .

A titre d'exemple, nous avons réuni dans le tableau 2, les valeurs trouvées expérimentalement pour le PF et le BT, respectivement pour une expérience en phase homogène et une expérience en phase hétérogène, à 0.1M et à 0.01M.

Résultats

Le nombre de sites et la constante d'association, ainsi que l'enthalpie libre ΔG ont été calculés, pour les 4 colorants et les différentes conditions expérimentales, à partir de tableaux de ce genre. Ces résultats sont rassemblés dans le tableau 3 et dans le tableau 4.

Chacun des quatre colorants forme des complexes avec le RNA comme avec les polynucléotides de synthèse. Aux faibles valeurs de r, on observe le complexe 1 dont les caractéristiques spectrales (fig. 2) sont les mêmes que dans le cas du complexe d'intercalation avec le DNA.

A des valeurs de r plus grandes, on observe, cependant, l'apparition d'un deuxième maximum, à un λ plus court

TABLEAU 2

RESULTATS EXPERIMENTAUX

A) Proflavine + RNA 28S + 18S, pH 5

0.1 M					0.01 M				
Phase homogène			Phase hétérogène		Phase homogène			Phase hétérogène	
r	r/Ao x 10^3	log Ao	r	log Ao	r	r/Ao x 10^3	log Ao	r	log Ao
0,047	9,46	- 5,31	0,019	-5,10	0,042	6,03	- 5,70	0,023	- 5,93
0,054	5,43	- 5,00	0,029	- 4,96	0,048	3,62	- 5,31	0,033	- 5,33
0,060	4,07	- 4,89	0,039	- 4,80	0,053	3,13	- 4,89	0,044	- 5,24
0,065	2,74	- 4,62	0,047	- 4,62	0,058	2,07	- 4,56	0,056	- 5,21
0,071	2,23	- 4,50	0,050	- 4,38	0,066	2,80	- 4,64	0,068	- 5,16
0,076	1,77	- 4,37	0,062	- 4,14	0,071	2,40	- 4,33	0,114	- 5,03
0,078	1,42	- 4,26	0,079	- 4,11	0,077	2,03	- 4,44	0,135	- 4,51
0,086	1,23	- 4,19	0,089	- 3,98	0,085	1,75	- 4,32	0,156	- 4,70
0,091	1,16	- 4,11	0,103	- 3,91	0,088	1,54	- 4,25	0,180	- 4,68
0,096	1,09	- 4,06	0,121	- 3,87	0,095	1,41	- 4,19	0,201	- 4,59
0,100	0,94	- 3,98	0,132	- 3,80	0,099	1,37	- 4,15	0,222	- 4,52
0,105	0,90	- 3,94	0,150	- 3,76	0,103	1,17	- 4,04		
0,108	0,79	- 3,87			0,109	1,07	- 3,95		
0,112	0,69	- 3,80			0,113	0,98	- 3,96		
0,116	0,69	- 3,78			0,117	0,91	- 3,90		
0,120	0,64	- 3,74			0,121	0,86	- 3,84		
0,123	0,61	- 3,70			0,126	0,82	- 3,82		
0,126	0,55	- 3,66			0,130	0,77	- 3,78		
0,128	0,54	- 3,64			0,135	0,75	- 3,75		
					0,139	0,70	- 3,71		

T A B L E A U 2 (suite)

B) Bleu de Toluidine + RNA 28S + 18S, pH 5

0,1M					0,01M				
Phase homogène			Phase hétérogène		Phase homogène			Phase hétérogène	
r	r/Ao x 10^3	log Ao	r	log Ao	r	r/Ao x 10^3	log Ao	r	log Ao
0,028	2,15	- 5,89	0.024	- 5,70	0,034	1,78	- 5,73	0,021	- 5,77
0,034	1,78	- 5,73	0.035	- 5,53	0,040	2,10	- 5,73	0,031	- 5,49
0,038	1,18	- 5,50	0.047	- 5,29	0,045	1,73	- 5,59	0,042	- 5,31
0,043	1,13	- 5,43	0.058	- 5,15	0,050	1,47	- 5,47	0,054	- 5,44
0,047	0,86	- 5,28	0.069	- 5,08	0,054	1,25	- 5,37	0,063	- 5,15
0,052	0,92	- 5,26	0.091	- 4,87	0,059	1,11	- 5,28	0,085	- 5,02
0,055	0,73	- 5,13	0.115	- 4,78	0,063	1,03	- 5,22	0,094	- 5,04
0,060	0,75	- 5,10	0.139	- 4,73	0,068	0,95	- 5,15	0,131	- 5,04
0,063	0,63	- 5,01	0.163	- 4,69	0,072	0,87	- 5,09	0,151	- 4,89
0,068	0,64	- 4,98	0.187	- 4,66	0,076	0,77	- 5,01	0,174	- 4,88
0,071	0,63	- 4,96	0.213	- 4,66	0,079	0,71	- 4,96	0,197	- 4,89
0,075	0,66	- 4,96	0.237	- 4,64	0,083	0,65	- 4,90	0,221	- 4,92
0,079	0,54	- 4,85			0,086	0,61	- 4,86		
0,083	0,52	- 4,81			0,090	0,57	- 4,81		
0,086	0,49	- 4,76			0,093	0,53	- 4,77		
0,091	0,49	- 4,74			0,096	0,50	- 4,73		
0,094	0,47	- 4,71			0,099	0,48	- 4,69		
0,097	0,45	- 4,68			0,102	0,45	- 4,66		
0,100	0,42	- 4,69			0,105	0,43	- 4,62		
0,103	0,41	- 4,61			0,106	0,40	- 4,58		
0,105	0,40	- 4,58							

TABLEAU 3

Macromolécules	Cond. Experiment.	P Y		P F		B T		A O	
		n1	n2	n1	n2	n1	n2	n1	n2
ARN 28S + 18S	Phase hétérogène 0.1M	0.12	0.25	0.052	0.099	0.048	0.090	0.024	0.091
	Phase homogène pH 5 0.1M	0.18	0.30	0.063	0.091	0.028	0.065	-	0.057
	" 0.2M	0.11	0.31	0.065	0.097	0.031	0.064	-	0.065
	pH 5 0.01M	0.16	0.26	0.055	0.105	0.073	0.115	0.055	0.109
	6 "	0.15	0.26	0.063	0.088	0.094	0.121	0.055	0.094
	7 "	0.20	0.32	0.051	0.088	0.095	0.128	0.061	0.094
	8 "	0.16	0.31	0.060	0.100	0.091	0.138	0.062	0.112
	pH_+ 5 0.01M								
	Na_+ 0.01M	0.15	0.26	0.049	0.099	0.081	0.150	0.055	0.098
	Li_+ 0.01M	0.22	0.30	0.060	0.109	0.083	0.138	0.04	0.108
	Cs_+ 0.01M	0.16	0.25	0.063	0.123	0.090	0.137	0.06	0.109
	NH_{++} 0.01M	0.17	0.30	0.065	0.118	0.073	0.133	0.05	-
	Mg_+ 10^{-4} M	0.12	0.21	0.037	0.072	0.032	0.060	-	-
	Ag 10^{-4} M	(0.23)	-	0.068	(0.11)	0.053	0.109	0.03	0.108
ARN 28S	pH 7 0.01 M	0.14	0.30	0.077	0.150	0.145	0.206	0.065	0.135
ARN 18S		0.10	0.12	-	-	-	-		
poly A + poly U 2 brins		0.11	0.19	0.039	0.081	0.055	0.100	0.05	0.092
poly A + poly U 3 brins		0;07	0.11	0.036	0.074	0.053	0.082	-	0.068
poly I + poly C		0.06	0.12	0.049	0.086	0.094	0.191	0.04	0.063

TABLEAU 4

	Py	PF	BT	AO
$10^{-6} \times k_1$	7,8	20	0,65	6
ΔG_1 (KCal/mole)	9,3	9,8	7,8	9,1
$10^{-5} \times k_2$	7,7	4,3	1,8	6
ΔG_2 (KCal/mole)	7,9	7,5	7,1	7,8

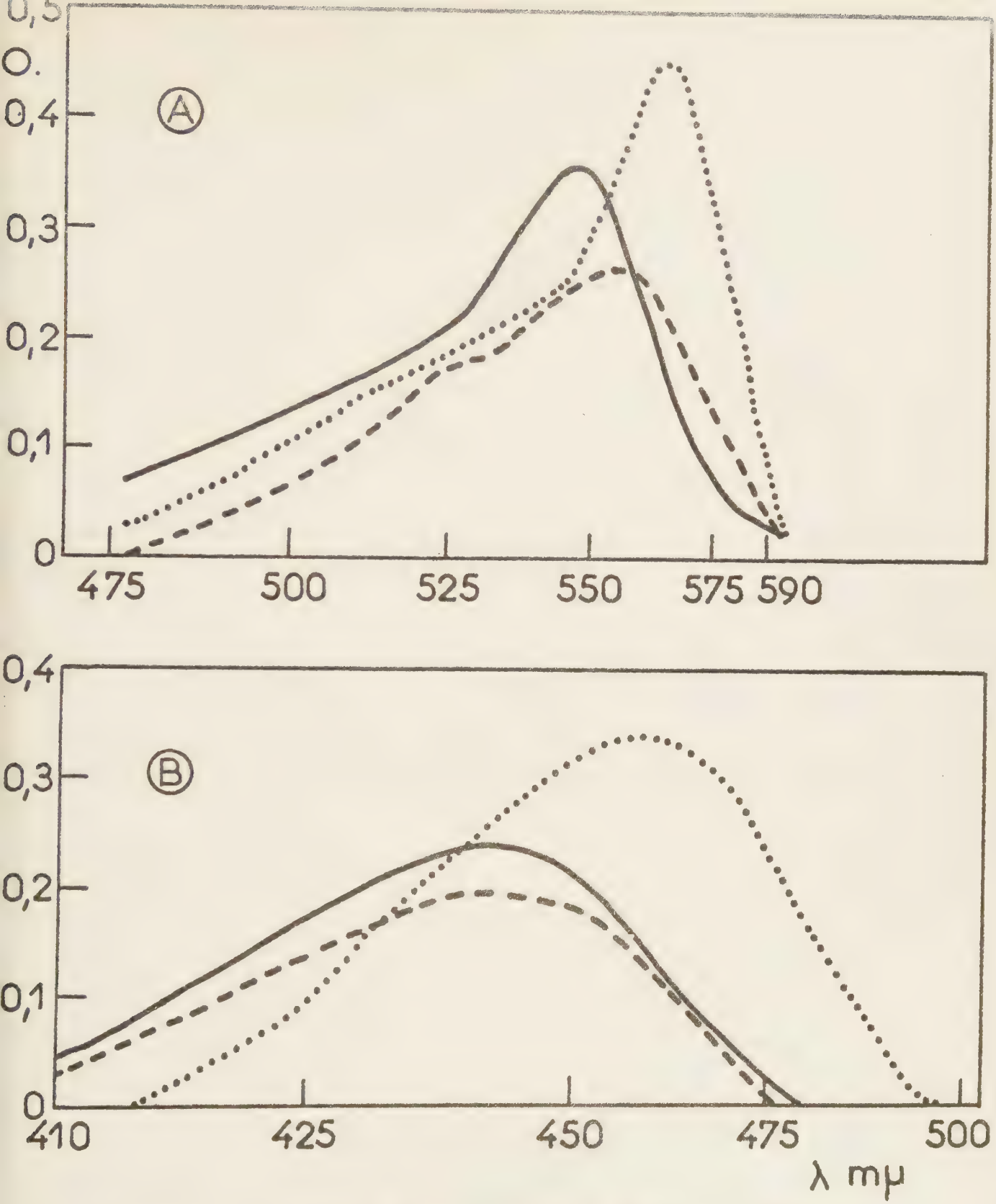


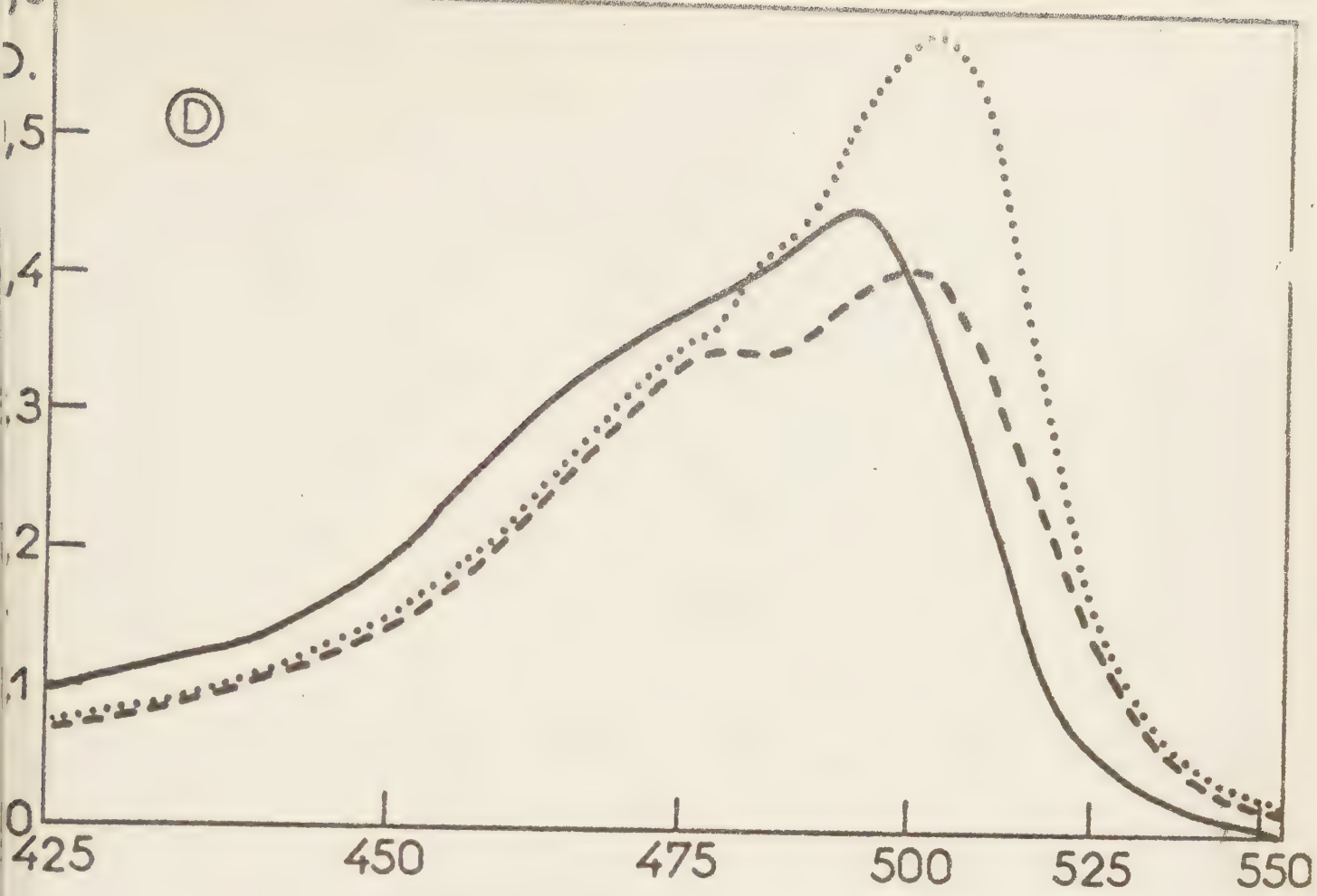
Figure 2. - Spectres des colorants à pH 7 et 10^{-2}M

_____ libres

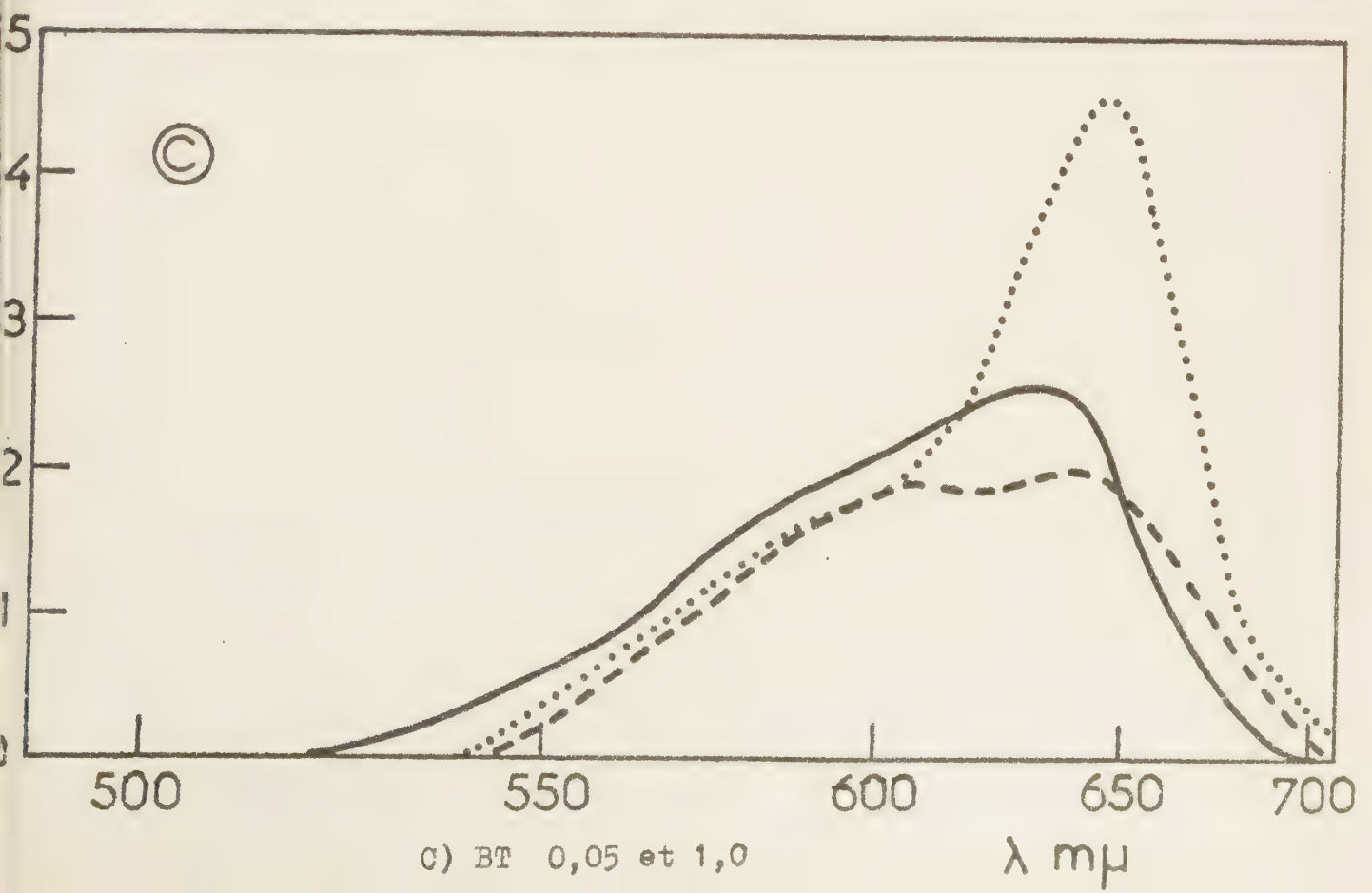
..... liés dans le complexe 1

_ _ _ _ _ liés dans le complexe 2

A) Py - 0,25 et 2,0 B) PF - 0,05 et 1,0



D) AO 0,05 et 1,0



C) BT 0,05 et 1,0

que celui du maximum du colorant libre, indiquant la formation du deuxième complexe extérieur. Dans le cas des colorants coopératifs BT et AO, ce maximum représente un pic nouveau, avec un minimum au λ caractéristique du colorant libre. Dans le cas des colorants non coopératifs, PY et PF, on n'observe que l'apparition d'une épaule. Dans tous les cas, une hypochromicité se manifeste. Quand r est relativement grand, il y a donc formation simultanée du premier et du second complexe.

Les isothermes tracés à partir des résultats obtenus en phase hétérogène représentent cet état de faits : le colorant lié, et en premier et en deuxième complexe sédimente avec le RNA ; A_{b1} et par la suite n et r sont systématiquement surestimés. Ceci est particulièrement évident en force ionique 0,01M et, pour les colorants coopératifs.

Quand on trace les isothermes à partir des valeurs obtenues en phase homogène, seul A_{b1} est déterminé, le deuxième complexe n'intervient pas. Cependant, on observe aussi bien dans la représentation de BJERRUM (fig. 3) que dans celle de SCATCHARD (fig. 4), des courbes qui permettent deux interprétations :

1) Il existe des sites hétérogènes, de n et de k, différents et nettement distincts à l'intérieur du premier complexe. A chacun de ces groupes correspond une droite qui coupe l'abscisse en n et l'ordonnée en k · Rn dans la représentation de SCATCHARD.

* 2) Des répulsions électrostatiques fortes s'établissent entre les molécules de colorant liées. Dans ce cas, l'expression de SCATCHARD donnerait une courbe avec une concavité tournée vers le haut.

Les faibles valeurs de n paraissent exclure la deuxième hypothèse. Nous avons donc introduit deux valeurs n_1 et n_2 correspondant à deux groupes de sites nettement

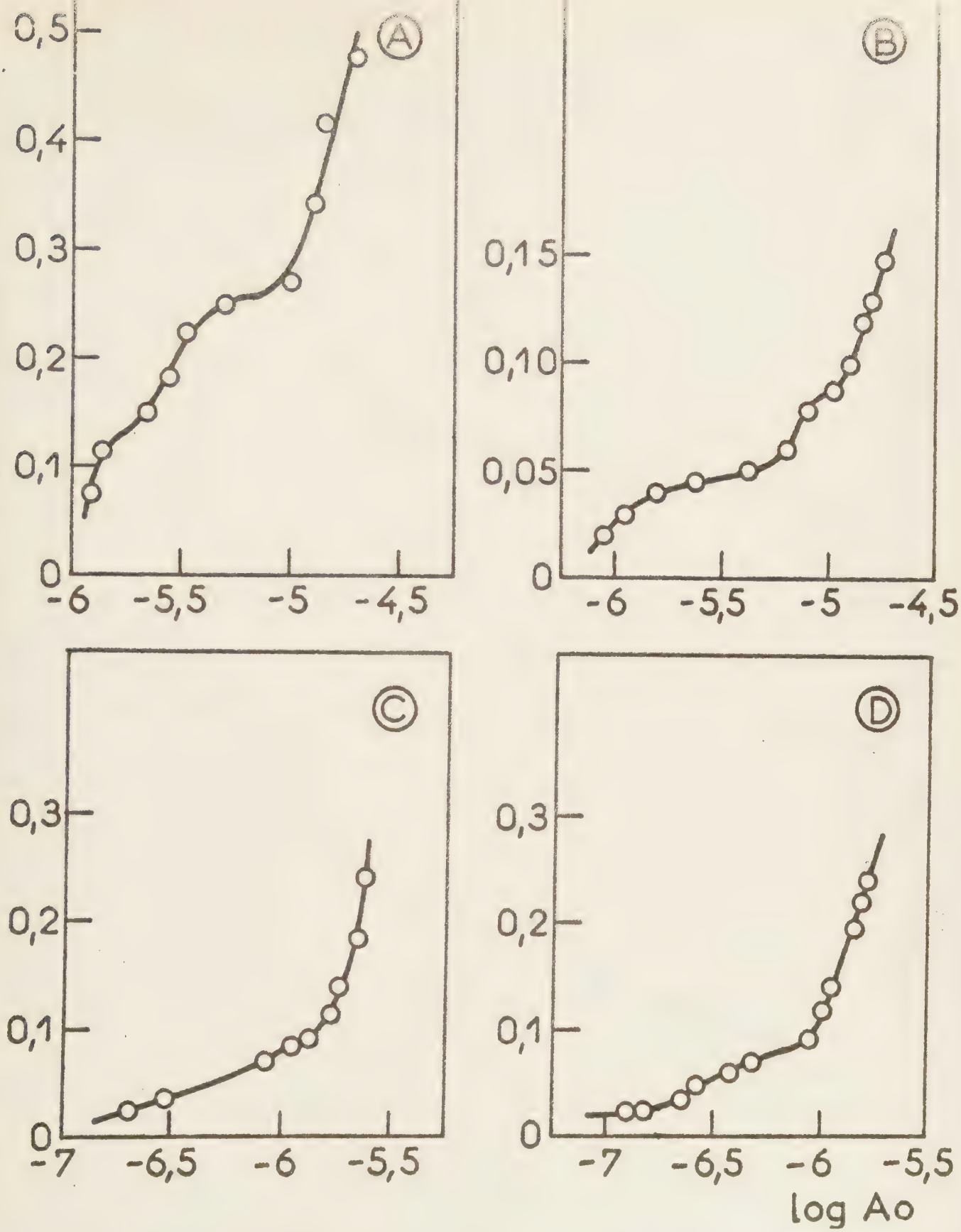
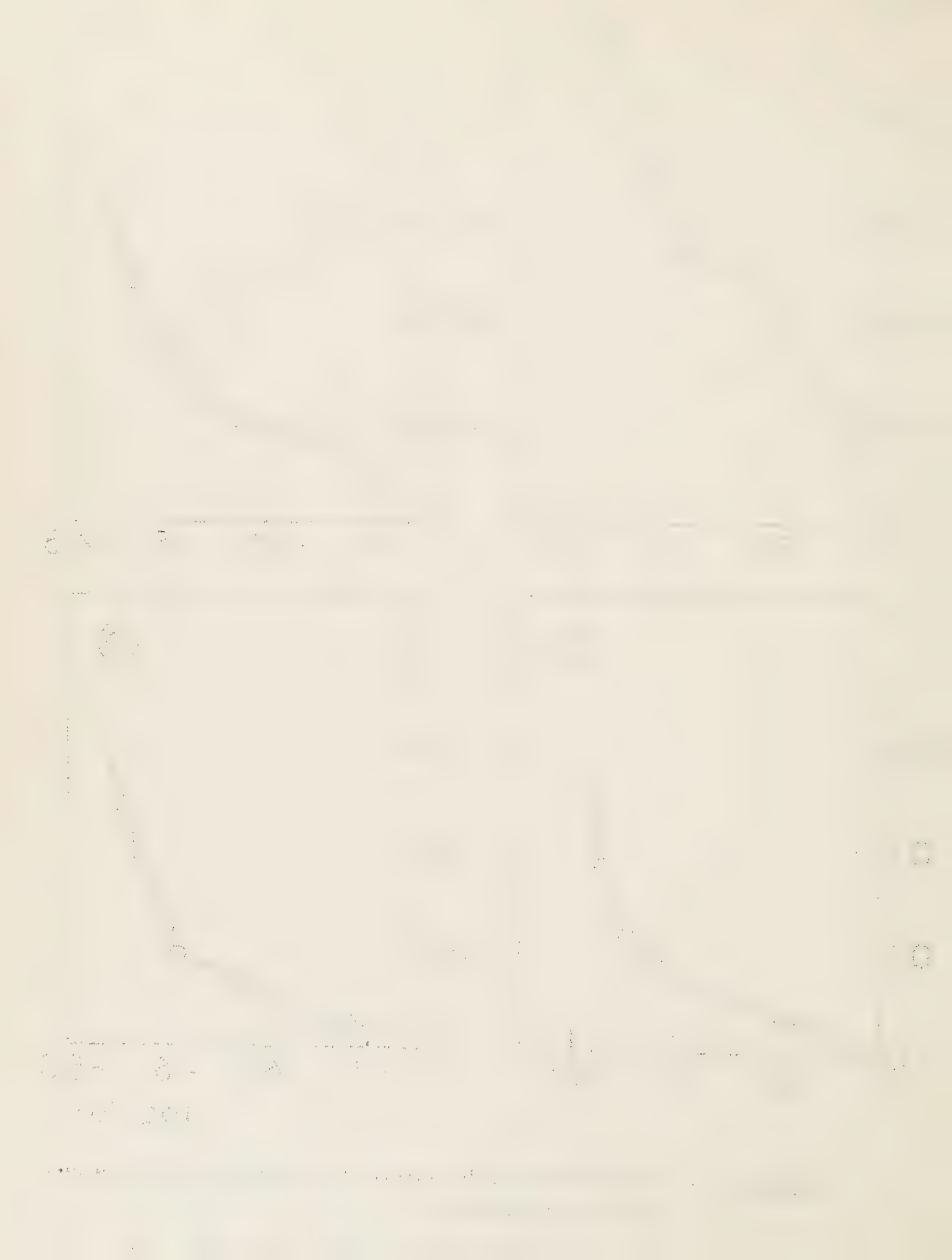


Figure 3. - Détermination du nombre de sites par la représentation de Bjerrum

3 a : Phase hétérogène à pH 5 et 0,1 M



3 b : Phase homogène (pH 7 et 10^{-2}M) dans le cas de Py et des complexes poly A + poly U et poly I + poly C. On remarquera l'allure très coopérative du phénomène.

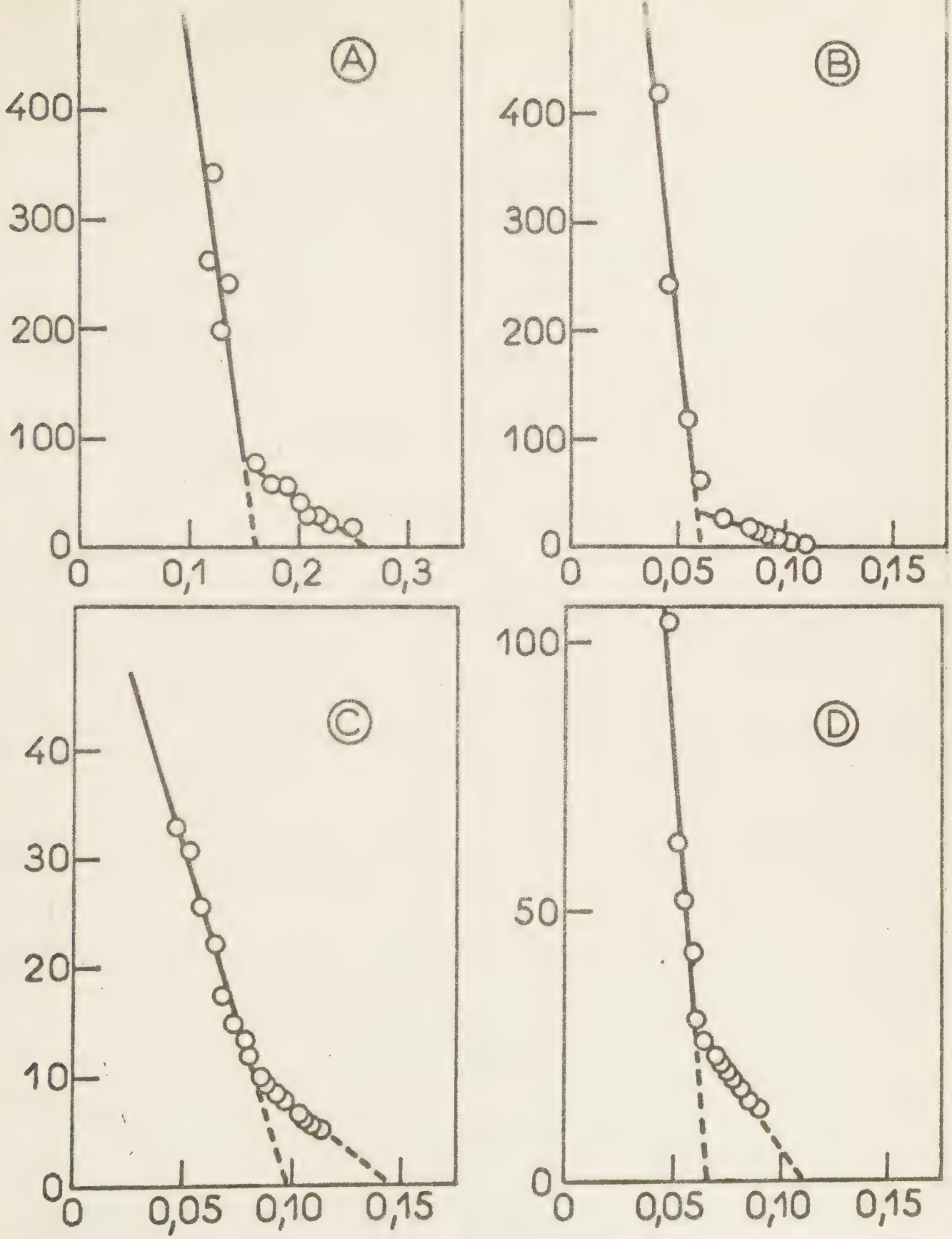


Figure 4. - Détermination du nombre de sites n et de la constante d'association k en phase homogène (pH 8 10^{-2}M) par la représentation de Scatchard

A) Py B) PF C) BT D) AO

distincts à l'intérieur du premier complexe. Des diagrammes de ce genre ont déjà été observés (14) (36).

Avant d'interpréter le tableau 3, une remarque s'impose : en 0,1M, il existe un écart assez grand entre les valeurs mesurées en phase hétérogène et homogène, uniquement dans le cas de BT et AO, c'est-à-dire des colorants formant facilement le complexe II. Il est donc possible que la formule (1) donne des valeurs trop faibles de A_{b1} donc de n_1, en phase homogène.

Inversement, les valeurs en phase hétérogène peuvent être trop grandes, puisque le colorant lié correspond à la fois au premier et au deuxième complexe. r et n sont donc surestimés. Par conséquent, les valeurs de n_1 et de n_2 sont probablement intermédiaires entre celles trouvées en phase hétérogène et celles trouvées en phase homogène.

Aucune variation systématique ne peut être décelée fonction du pH et dans le groupe des cations Na^+ , Li^+ , Cs^+ et NH_4^+ .

Le Mg^{++} réduit le nombre de sites ; cette diminution est particulièrement importante dans le cas de PF et de BT.

L' Ag^+ forme des complexes aussi bien avec les colorants libres qu'avec les colorants complexés comme en témoigne le déplacement des maxima d'absorption :

T A B L E A U 1

(Milieu 0.01M - pH 5)

Colorant	max. colorant libre		max. colorant fixé	
	+ Na^+	+ Ag^+	+ Na^+	+ Ag^+
Proflavine	441	442	460	463
Pyronine	545	425	565	573
Bleu de Toluidine	628	622	647	649
Acridine Orange	490	490	502	504

L'augmentation de la force ionique ne modifie pas n dans le cas des colorants non coopératifs. Dans le cas des colorants coopératifs, elle paraît le réduire, mais l'imprécision de l'estimation à la suite de la formation simultanée du complexe II pourrait en être la cause. n_1 et n_2 diminuent dans l'ordre PY > BT > PF - AO.

Le RNA 28S présente plus de sites que le RNA 18S. Le poly-A + poly-U 2 brins a plus de sites que le composé 3 brins.

Le poly-A + poly-U fixe plus de PY que le poly-C + poly-I, tandis que c'est l'inverse pour le BT.

B) DESORPTION DU COLORANT ET TEMPERATURE DE TRANSITION

Protocole expérimental

Deux colorants seulement (PF et AO) ont été utilisés pour suivre en fonction de la température la libération de colorant qui se traduit par une augmentation de densité optique dans le visible. On a choisi respectivement 443 mu et 475 mu pour PF et AO.

Les mélanges polymère-colorant ont été préparés comme décrit dans le chapitre "Matériel".

λ = 443 mu correspond au maximum d'absorption de la PF libre. Tant que le colorant désorbé est sous forme de colorant libre, on trouvera une augmentation de la D.O à cette longueur d'onde. Quand il se trouvera sous forme de complexe II, on observera une diminution de la D.O, λ= 475 mu correspond pour AO au point isobestique monomère-dimère. Par conséquent, on trouvera une augmentation de la D.O tant que le colorant désorbé est libre ou lié en complexe II. Or, les colorants coopératifs peuvent être non seulement en forme de dimère, mais aussi en forme de polymère, chaque polymère

ayant un maximum d'absorption caractéristique à des longueurs d'onde plus courtes que le maximum d'absorption du dimère (43). Une diminution de la D.O peut alors traduire la présence du colorant sous forme de polymère.

Résultats

a) Comme dans le cas du DNA (22), on observe une désorption coopérative du colorant, caractérisée par une température T'_m en général plus élevée que la température de fusion T_m du polymère seul (fig. 5). Les valeurs de ΔT sont du même ordre que celles trouvées pour le DNA dans les mêmes conditions. Elles sont, cependant, nettement plus élevées pour le poly-AU que pour le RNA ou le poly-IC. L'ensemble des résultats se trouve rassemblé dans les tableaux 5, 6 et 7.

b) La désorption de l'acridine orange des polynucléotides se fait en deux étapes, chacune avec une température caractéristique T'_m. Le phénomène est masqué dans le cas des RNA car on opère cette fois en 0,1M et l'étalement de la transition sur plus de 50°C s'observe aussi bien à l'état natif qu'en présence de colorant.
La proflavine, au contraire, est désorbée en une seule étape quel que soit le polymère.

c) Il est, enfin, significatif que, dans tous les cas, on observe après la dernière phase de désorption une diminution de la densité optique.
Les spectres du complexe à cette température montrent qu'il y a fixation du colorant libéré sur les sites du complexe II extérieur.

Après refroidissement lent du mélange, le spectre initial réapparaît, indiquant que le phénomène est réversible.

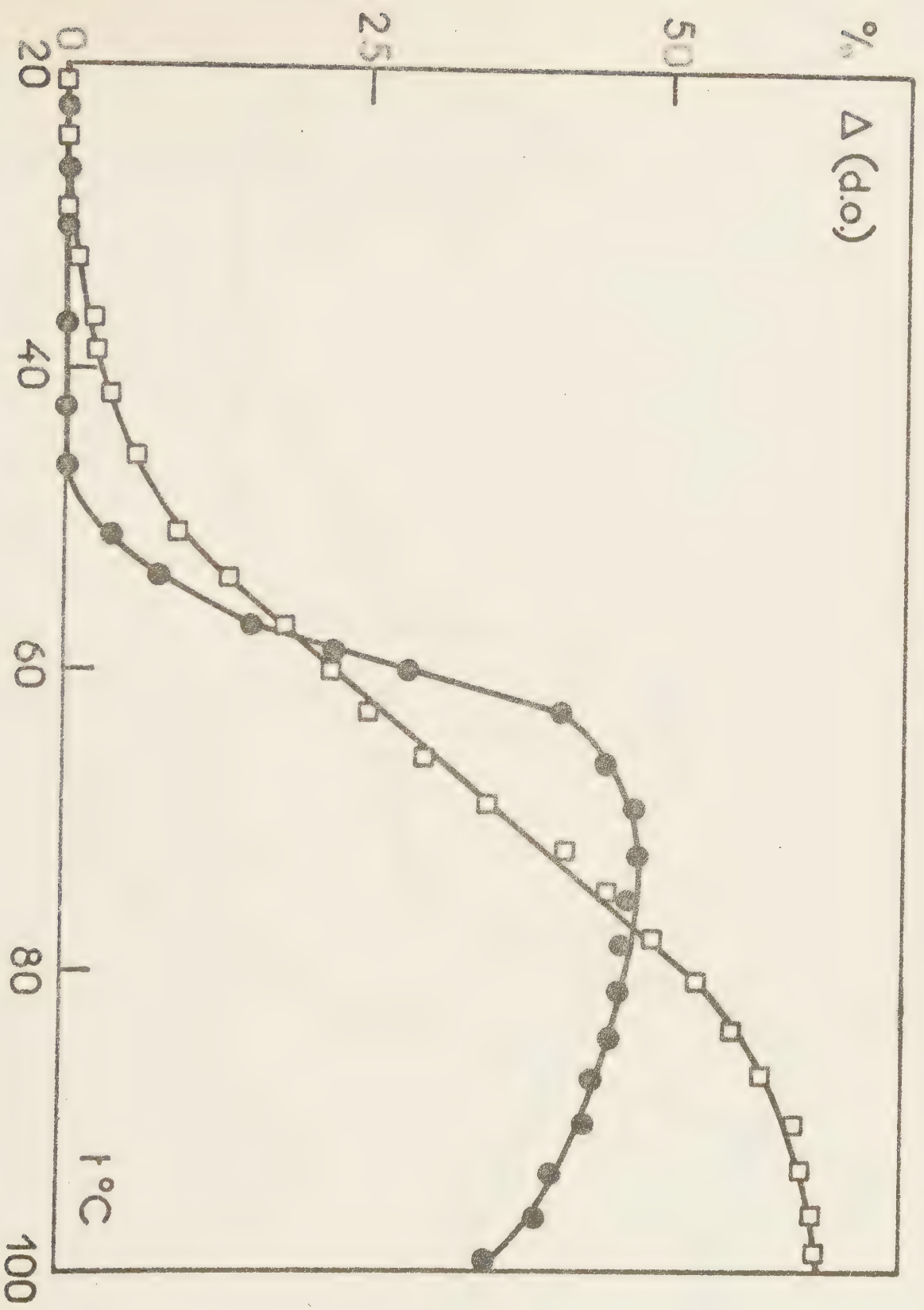
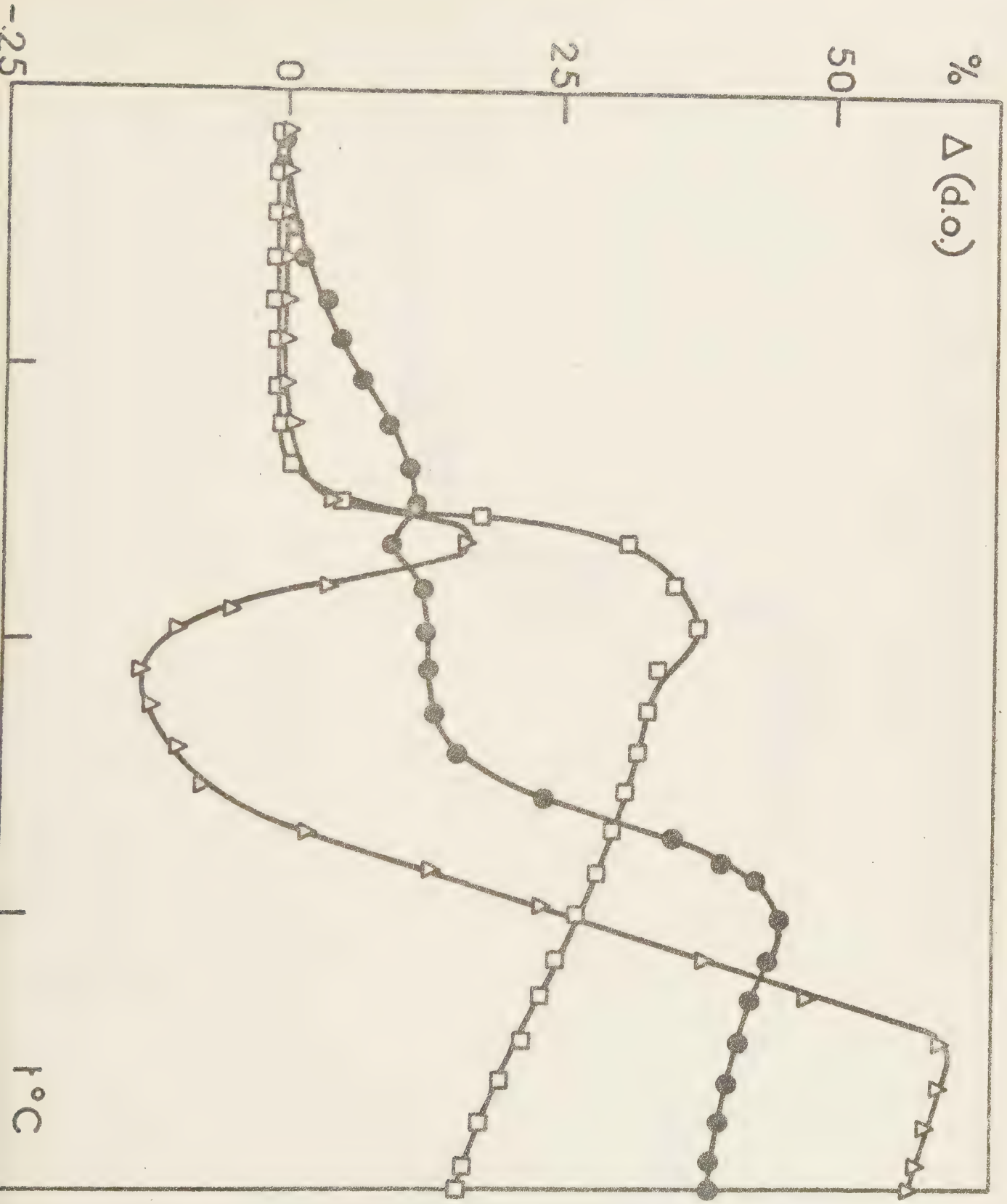


Figure 5. - Courbes de désorption du colorant avec la température

5 a □ PF + RNA (r_f^* = 0,02 - 0,1 M)

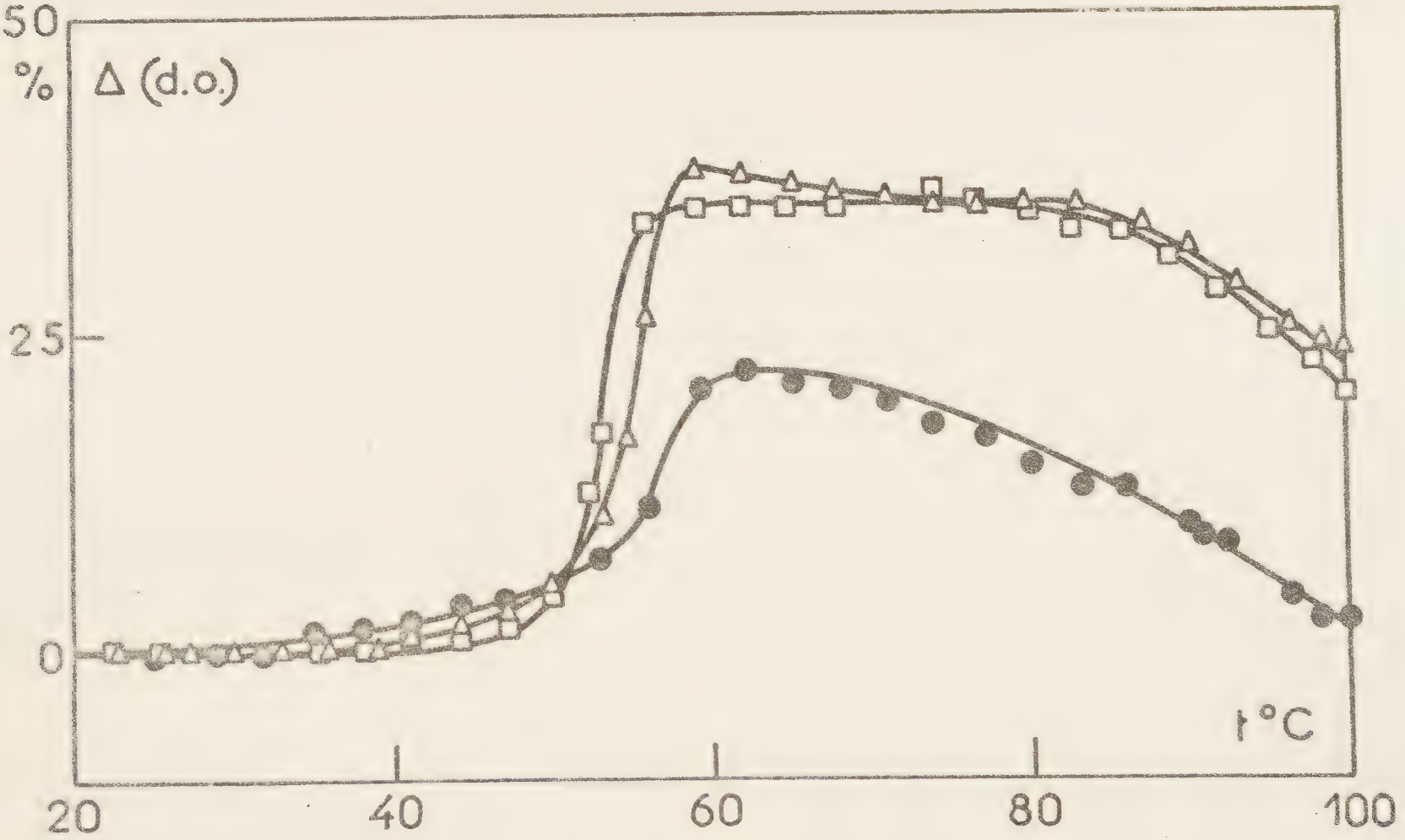
●●● PF + poly (A+U) (r_f = 0,02 - 0,01 M)



5 c AO + Poly (I + C) □ r_f = 0,01

Δ r_f = 0,05

●●● r_f = 0,2



5 o AO + Poly (I + C)□ r_f = 0,01

Δ r_f = 0,05

... r_f = 0,2

T A B L E A U 5

Polymère	mu	Conditions	$T°_m C$
RNA 28S + 18S natif	260	0,1M	60
RNA 28S	"		65
RNA 18S	"	pH 7	61
RNA 28S + 18S reconstitué			
		0,01M	
Poly A + Poly U	"		45
Poly I + Poly C	"	pH 7	49

T A B L E A U 6

Conditions	Polymère	475	$r_f = A_{T/P}$	T'm
	RNA 28S + 18S AO natif		0.012	73,5
			0.024	71
			0.060	69
0,1M			0.120	67
	RNA 28S AO		0.027	76
pH 7			0.054	73
	RNA 18S AO		0.027	67
			0.054	65
	RNA 28S + 18S reconstitué AO		0.027	80
	0.01M pH 7 Poly A + poly U AO		0.01	62-79
			0.02	65-80
			0.05	59-76
0,01M			0.10	61-76
pH 7	Poly I + Poly C AO		0.013	51
			0.054	49-77
			0.219	39-73
	0.1M pH 7 RNA 28S + 18S PF natif	443	0.012	68
			0.024	65
			0.048	62
			0.060	60
0,01M	RNA 28S PF		0.027	61
			0.054	56
pH 7	RNA 18S PF		0.027	56
			0.054	56
	RNA 28S + 18S reconstitué PF		0.027	59
	0.01M pH 7 Poly A + Poly U PF		0.01	52
			0.02	59
0,01M			0.05	58
			0.10	59
pH 7	Poly I + Poly C PF		0.013	53
			0.054	55
			0.219	56

TABLEAU 7

	r	$T_{théor.}$	$T'_m - T_m$ (PF)	$T' - T_m$ (AO)
poly (A + U)	0	0	0	0
	0,01	0,66	7	17
	0,02	1,32	14	20
	0,05	3,3	13	14
	0,1	6,6	14	16
poly (I + C)	0,013	0,86	4	2
	0,054	3,5	6	0
	0,219		7	- 10

DISCUSSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

1) Existence de deux familles de sites dans le complexe I

Dans le cas du DNA, l'insertion du colorant s'accompagne d'une détorsion locale et d'une rigidité accrue de la chaîne (15).

On n'observe jamais qu'un seul type de complexe I en raison de la structure hélicoïdale régulière. Il en est autrement, pour les RNA et les polyribonucléotides.

a) cas du RNA

Dans ce cas, il y a des régions en double hélice et des zones dont l'organisation n'est pas encore clairement définie. La composition en bases de ces RNA ribosomaux est, cependant, assez favorable à une structure en double hélice importante puisqu'on a sensiblement G = C et A = U .

La majeure partie des résultats concerne le mélange des deux RNA (28S et 18S) et, si leur structure secondaire est différente, on ajoute encore à l'hétérogénéité de la fixation.

Si l'on porte n_2 en fonction de n_1 dans le cas des RNA ribosomaux pour les différents colorants (fig. 6), les points correspondants aux valeurs moyennes du tableau s'alignent sur une droite passant par l'origine. Les sites n_1 et n_2 ne sont donc pas indépendants et l'insertion du colorant dans les premiers provoque l'apparition des seconds, puisque la différence $n_2 - n_1$ est proportionnelle à n_1 .

L' hypothèse la plus simple consiste à admettre que

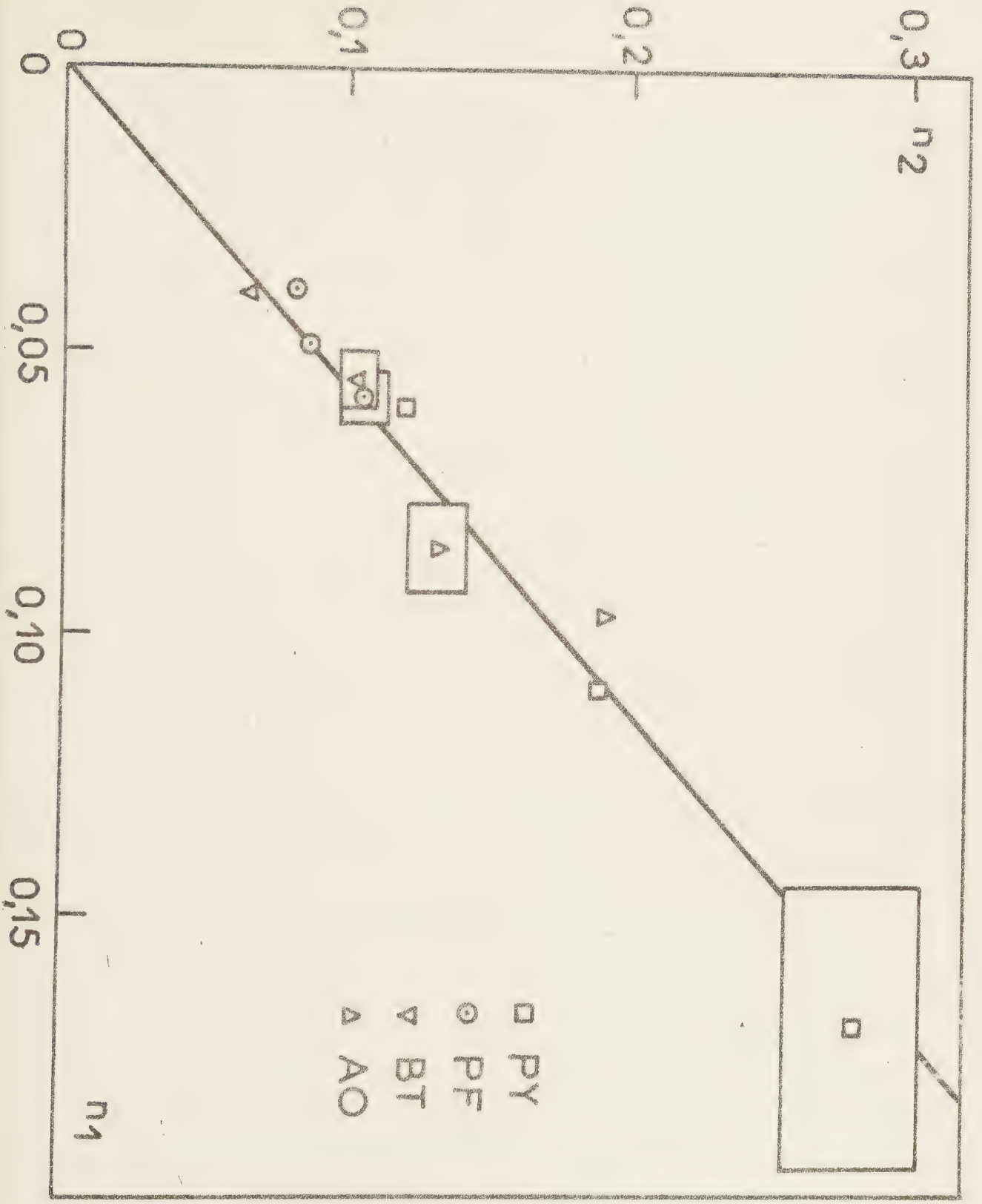


Figure 6. - Relation entre les nombres de sites n_1 et n_2 pour les différents colorants et les diverses conditions expérimentales (cf Tableau I).

les sites en nombre n_1 correspondant à l'insertion dans les régions en double hélice. La détorsion locale propage fait disparaître la structure régulière hélicoïdale, et, par suite, un grand nombre de sites.

Les $n_2 - n_1$ sites pourraient correspondre au modèle d'intercalation partielle décrit récemment (19) dans lequel subsiste un couplage base-colorant. Au total, le nombre n_2 de sites du complexe I est encore bien inférieur à ce qu'il serait dans une structure du type DNA.

b) Cas des complexes poly-A + U et poly I + C

Pour ces molécules, l'organisation est complète comme en témoignent les courbes de fusion. On retrouve, pourtant, les deux mêmes types de sites à l'intérieur du complexe I. De plus, les valeurs de n_1 et n_2 correspondantes se placent sur la droite tracée pour les RNA (fig. 6), et il n'y a pas d'écart important entre leurs valeurs et celles obtenues avec le RNA.

La structure en double hélice de ces polynucléotides apparaît donc beaucoup plus sensible que celle du DNA à la détorsion introduite par l'intercalation du colorant.

c) Spécificité entre colorants et bases

Les valeurs de n_1 et n_2 sont nettement plus élevées pour Py et BT dans le cas des RNA et spécialement du 30S. Le même ordre ne se retrouve pas dans les constantes d'association. On peut donc penser que la fixation de Py et BT est beaucoup moins sélective en raison peut-être de la présence d'un hétéroatome supplémentaire, O ou S.

Dans le cas des polynucléotides organisés et homogènes, on n'observe pas de sélection dans le cas de la PF et de l' AO, tandis que nettement plus de Py est fixé par poly-A

+ poly U que par le poly-I + poly C, et plus de BT par le poly-C + poly-I que par le poly-A + poly-U. Dans tous les cas, le composé 2 brins fixe plus de colorant que le composé 3 brins . Ce dernier fait s'explique aisément par la "fermeture" de certains sites par le brin poly-U qui entoure le composé 2 brins, et qui a déjà été décrit pour la fixation d'autres composés (42). Les autres résultats sont plus difficilement interprétables pour le moment.

Il faut, cependant, remarquer que l'intercalation est beaucoup moins spécifique en force ionique faible (37) puisque dans ces conditions l'écartement des groupes phosphates se trouve facilité par des répulsions électrostatiques fortes. Une étude en fonction de la force ionique serait donc nécessaire.

Toutefois, la spécificité de la fixation du BT et du Py pourrait s'expliquer par des différences de sélectivité dès l'abord moins grandes que pour le PF et l' AO et liées à l'hétéroatome .

Les données de désorption permettent, par contre, de faire des comparaisons intéressantes.

1) On observe que l'écart $T'_m - T_m$ est beaucoup plus important dans le cas de poly-A + U à la fois pour PF et AO que dans le cas de poly-I et C.

L'effet de stabilisation électrostatique est calculable d'après un modèle simple et on trouve en $10^{-2}M \Delta T_{él} = 66\ r$ (22).

Si on compare ces valeurs aux écarts expérimentaux, on observe une stabilisation locale importante pour le poly-A + poly-U, tout à fait comparable à celle observée pour le DNA.

Pour le poly-I + poly-C, au contraire, cette

stabilisation locale est pratiquement nulle pour AO et très faible pour PF. On peut interpréter qualitativement les résultats par l'existence d'un couplage Van der Waals entre plateau de base et colorant (AO et PF) beaucoup plus important pour A + U que pour I + C.

Il est à noter que l'analyse des courbes de transition du DNA à 260 mμ en présence d' AO indique que les paires A-T sont stabilisées préférentiellement (37).

2) Pour interpréter dans le cas de AO les deux transitions successives de désorption, il faut comparer les bilans énergétiques dans chaque cas.

La disparition de la structure secondaire provoque la désorption du colorant des sites du groupe n_1 (couplage entre colorants et plateaux de bases).

Une partie des molécules de colorant libéré vont pouvoir se fixer sur des sites du groupe n_2.

On sait, en effet, que la variation d'entropie accompagnant l'intercalation et qui correspond au changement de configuration locale, est positive à 20°C mais peut devenir négative à 60°C. Dans l'énergie de fixation sur le deuxième groupe (n_2), le terme entropique toujours positif proviendrait alors uniquement de l'hydratation et dépendrait de la température, de la force ionique et du colorant.

Puisque l'hydratation est moins sensible à l'augmentation de la température que la configuration locale, et qu'elle est la même quel que soit le groupe de sites occupés, plus de sites n_2 seront occupés aux températures élevées qu'à 20°. Le terme enthalpique étant pratiquement constant, il peut donc arriver que la variation totale d'énergie $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, , plus petite à 20° pour les sites du groupe II que pour ceux du groupe I, soit au contraire, plus grande vers 60° . Pourtant, une interprétation quantitative

demanderait une étude thermodynamique beaucoup plus complète,

3) Dans tous les cas, on observe finalement dans la courbe de désorption une diminution de la densité optique à haute température.

Cet effet est dû au déplacement du spectre par la formation du complexe extérieur. On sait (23 - 25) que, dans ce cas, la constante d'association va dépendre de la flexibilité de la chaîne puisque le phénomène est fortement coopératif.

On ne l'observe jamais dans le cas du DNA, ce qui semble indiquer que les deux chaînes du DNA conservent après fusion une rigidité beaucoup plus grande que celles du RNA ou des polynucléotides de synthèse.

2) Compétition avec les ions

Nous avons vu que les valeurs de n et de k pour les différents ions alcalins n'indiquaient aucune variation systématique.

Il n'en est pas de même pour Mg^{++} qui diminue systématiquement les valeurs de n_1 et n_2 . L'effet est très important pour n_1 dans le cas de PF.

Une telle inhibition a déjà été observée dans le cas du DNA (elle est à rapprocher de l'effet stabilisateur des ions Mg^{++} sur la structure secondaire et tertiaire du RNA (30). L'existence d'une chélation du type P-O-Mg-O-P proposée dans le cas du DNA (40) peut amener la formation de boucles dans la molécule de RNA et entraîner une diminution des sites du type n_1 .

Le cas de l' Ag^{+} est particulier, les complexes formés entre lui et les colorants libres et complexés diffèrent certainement des complexes formés entre le RNA et les

colorants. Afin de déterminer la nature de ces complexes, une étude approfondie serait nécessaire.

DEUXIEME PARTIE

ABSORPTION ET FIXATION DES COLORANTS BASIQUES PAR LES CELLULES ANIMALES VIVANTES

INTRODUCTION

Les colorants basiques capables de former *in vitro* des complexes avec le DNA et le RNA sont utilisés spécifiquement en histologie pour la mise en évidence du matériel génétique. Par exemple, l' AO provoque une fluorescence verte dans le noyau, une fluorescence rouge dans le cytoplasme (44) ; la Py est utilisée dans le test de LISON (1) pour différencier le DNA natif du DNA dénaturé et du RNA.

Ces mêmes colorants provoquent une série de réactions chez les organismes vivants et sont, en particulier, utilisés comme mutagènes pour les virus, les bactériophages, les bactéries et les levures (9 - 13, 45 - 54). La replication des virus et des phages peut être partiellement ou totalement inhibée. Cette inhibition peut être liée à la photosensibilisation ou à un effet direct des colorants (11, 55 - 92). Le phage inactivé par la lumière U.V. ne se prête plus à la réactivation par la lumière visible lorsque les bactéries ont été traitées au préalable par l'acridine-orange (92 - 99). En présence des colorants basiques, on a observé des perturbations du métabolisme, en particulier de celui des acides nucléiques (94 - 95), la diminution ou l'arrêt de la mitose (96 - 97) et de la croissance (97), et même une désintégration des cellules animales (98 - 100).

De l'ensemble des informations se dégage le tableau suivant : les colorants basiques sont fixés à l'intérieur des cellules ou des virus. Ils s'y trouvent dans le noyau et dans le cytoplasme. Leur action pourrait être attribuée à une fixation sur les constituants cellulaires qui, par la suite, ne pourraient plus assurer leurs fonctions normales. Le métabolisme des acides nucléiques est fortement atteint, la glucolyse semble très peu perturbée (94 - 95). Une modification

du matériel génétique a été mise en évidence dans le cas des virus, des bactériophages, des bactéries et des levures. Un autre mécanisme ferait intervenir la photosensibilisation, le complexe colorant-virus subirait alors une photooxydation. (60).

La formation des complexes du type 1, comme nous l'avons décrit dans la première partie, serait dûe au pouvoir mutagène des colorants basiques (101). La modification du spectre de la fluorescence indique la présence simultanée d'un complexe à forte énergie de liaison, et d'un complexe à faible énergie de liaison (97). Si, le premier peut être la cause des mutations, du type délétion et insertion, comme il a été proposé par LERMAN (101), le deuxième peut intervenir soit au niveau du RNA cytoplasmique soit au niveau des protéines, ou encore en modifiant les propriétés de la membrane cellulaire par sa fixation sur les mucopolysaccharides qui s'y trouvent. Une telle action indirecte, faisant intervenir le bloquage d'un enzyme réparateur, a été proposée par SETLOV (93, 102).

L'action biologique et, en particulier, l'action mutagène d'un colorant ne peut être que la conséquence d'une liaison entre ce colorant et un ou plusieurs constituants cellulaires. A priori, beaucoup des constituants cellulaires peuvent former des complexes avec les colorants : acides nucléiques (15) mucopolysaccharides (103), et protéines. Or, in vitro, la formation des complexes dépend essentiellement du rapport macromolécules/colorant, comme nous l'avons montré dans la première partie de ce travail. En principe, une seule espèce de macromolécules est présente ; in vivo, plusieurs espèces de macromolécules sont présentes dans chaque cellule. Certaines de ces macromolécules, telles que les protéines et les mucopolysaccharides de la membrane, les protéines et le RNA cytoplasmique sont plus accessibles que d'autres,

comme les nucléoprotéines liées au DNA qui se trouvent dans le noyau.

De plus, une cellule en tant qu'organisme vivant est capable de réagir à l'introduction de composés qui lui sont étrangers tels que les colorants.

Enfin, la distance entre les cellules individuelles dans une population intervient. A certaines concentrations cellulaires, la vitesse de l'incorporation des acides aminés et du P minéral diminue proportionnellement à la distance moyenne entre les cellules (104).

On dispose de nombreuses informations sur l'activité biologique des colorants d'une part et sur la formation de complexes entre ces colorants et des acides nucléiques in vitro d'autre part, mais on n'a que peu de connaissances sur le mécanisme de l'incorporation de ces colorants dans les cellules. Or, sans connaissances précises de ce premier stade, une interprétation quelconque du mécanisme d'action ne peut être que spéculative.

Nous nous sommes donc proposés d'étudier les lois qui gouvernent l'incorporation de certains colorants basiques par les cellules animales, colorants dont on connaît la capacité de former des complexes avec les acides nucléiques, in vitro et le pouvoir mutagène : BT, PF, AO et Py.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la distribution intracellulaire de ces colorants ; dans ce but, nous avons déterminé dans certaines fractions cellulaires, la teneur en colorant, protéines et acides nucléiques, nous avons cherché s'il existait une corrélation entre la teneur de ces fractions en colorant et leur teneur en ces macromolécules.

MATERIEL ET METHODES

Les préparations de BT, Py et PF sont décrites dans le chapitre "Matériel et Méthodes" de la première partie. L'AO purifié étant peu soluble dans les milieux employés, nous avons dû utilisé l' AO Fluka brut.

Les cellules utilisées étaient des cellules d'ascite de Krebs II de la souris, et des cellules d'ascite de l'hépatome de ZAJDELA du rat. Les cellules de Krebs sont malignes et différenciées ; les cellules de ZADJELA également malignes, conservent, cependant, la plupart des caractéristiques des cellules de foie normal, en particulier, leur équipement enzymatique. Les cellules sont obtenues par ponction intro-péritonéale (rats, 10 jours après inoculation, souris, 7 jours après inoculation). Elles sont ensuite lavées dans du tampon PBS (105), jusqu'à ce que le surnageant ne contienne plus de liquide ascitique et de globules rouges, puis remises en suspension dans du milieu de EARLE (solution saline glucosée) (106). Elles sont ensuite placées dans des ERLENMEYERS fixés sur une machine à agitation circulaire à 60 tours/minute (conçue pour être rigoureusement sans secousse) (Swirling culture). L'incubation des flacons est faite dans une chambre dont la température est réglée à 37°. Dans ces conditions, les cellules se maintiennent en vie sans toutefois se multiplier. Lorsque l'on détermine le nombre de cellules vivantes par coloration à l'éosine (l'éosine ne colore que les cellules mortes) on constate après 24 heures que moins de 5 % des cellules sont colorées.

Afin d'exclure tout effet de photosensibilisation, les mélanges colorant-cellules ont été faits dans l'obscurité, ainsi que l'incubation.

Après l'incubation, un aliquot de la suspension est prélevé et partagé en deux portions. La première est conservée telle quelle, la deuxième est centrifugée pendant 5 minutes à 5000 tours/minute, afin de sédimenter les cellules le surnageant est décanté. On prend un volume égal de ce surnageant et de la suspension, et chaque échantillon est dilué dans un volume égal d' H_2O distillée, congelé rapidement dans un bain d'alcool-carboglace et décongelé à 37°. Dans ces conditions, les cellules éclatent. On dilue alors avec deux volumes d'éthanol froid, conserve les échantillons à - 20° pendant 30 minutes, centrifuge pendant 5 minutes à 5000 tours/minute, et décante le surnageant. Le surnageant est limpide et coloré, le culot incolore ou très faiblement coloré. La faible coloration observée est dûe aux traces de surnageant résiduel. Le spectre du surnageant correspond à celui d'une solution témoin de colorant, il est, par conséquent possible de doser le colorant par sa D.O dans les limites de la validité de la loi de BEER-LAMBERT.

La concentration du colorant dans le surnageant est alors mesurée par comparaison de sa D.O avec celle d'une solution témoin. La concentration du colorant dans les cellules est déterminée par la différence entre la D.O des échantillons complets et celle du surnageant. Cette différence de D.O est alors comparée avec la D.O d'une solution témoin.

Les valeurs de la D.O obtenues pour le surnageant sont faibles et la précision mauvaise. Pour y remédier, on mesure alors la D.O du surnageant directement, et on la compare avec celle d'une solution témoin. L'examen des spectres du surnageant montre que le colorant s'y trouve à l'état libre, et que la loi de BEER-LAMBERT est valable.

Afin d'étudier la distribution intracellulaire des colorants, nous n'avons utilisé que les cellules de ZAJDELA.

Celles-ci se prètent mieux à un fractionnement que les cellules de Krebs. Afin d'obtenir des cellules colorées in vivo , nous avons incubé 100 ml d'une suspension de 2 10^6 cellules/ml avec, respectivement, 2 µgr PF/ml, 2 µgr BT/ml, 50 µgr Py/ml et 4 µgr AO /ml, pendant 90 minutes. Après l'incubation, nous avons centrifugé les cellules pendant 10 minutes à 2000 tours/minute, éliminé le surnageant et resuspendu les cellules dans 4 ml d'une solution de sucrose 7 % contenant 10^{-4}M $CaCl_2$. Cette suspension est congelée rapidement et décongelée dans un bain-marie à 37°. Dans ces conditions, 40 % des cellules éclatent, sans que les organelles soient trop lésées. 2 ml de la suspension sont alors déposés sur des tubes de gradient discontinu (107) contenant quatre couches de sucrose (de densités différentes : 75 %, 65 %, 55 %, 45 % de sucrose dans 10^{-4}M $CaCl_2$). Les tubes sont centrifugés pendant 14 heures à 23.000 tours/minute dans une ultracentrifugeuse SPINCO préparative, rotor SW 25.

Les fractions prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur et des aliquots de chaque fraction sont conservées pour le dosage des colorants, des protéines, du DNA et du RNA. De chaque fraction, un frottis a été préparé et coloré par le procédé MAY-GRUNWALD.

La quantité de colorant est déterminée dans chaque fraction après désorption du colorant par l'alcool comme il a été décrit plus haut et par comparaison avec une solution témoin.

Afin de pouvoir doser les acides nucléiques, il est nécessaire de débarrasser la suspension du sucrose. Par conséquent, nous avons dilué chaque échantillon par 24 volumes d'eau distillée, et nous avons précipité les macromolécules à froid par l'acide perchlorique. (c finale 3,5 %). Après centrifugation, le culot a été levé 3 fois par du

P.C.A. 3,5 % et resuspendu dans de l'eau. Le DNA a été dosé par la méthode de BURTON modifiée (108), le RNA d'après la méthode de BARUN et coll. (109) modifiée d'après ZALTA (11o) les protéines par le biuret (111).

En nous basant sur les résultats de ces dosages, nous avons calculé la distribution des colorants, du DNA, du RNA et des protéines parmi les différentes fractions. Pourtant, ces pourcentages ne reflètent que la quantité absolue de colorant. Afin de chercher une relation éventuelle entre la distribution des colorants et celle des macromolécules, il était nécessaire de déterminer la valeur relative de colorant de DNA, de RNA et des protéines dans chaque fraction. Dans ce but, nous avons d'abord calculé le pourcentage de macromolécules dans chaque fraction, en nous basant sur la somme de leurs poids. Ensuite, pour chaque fraction cellulaire, nous avons divisé le pourcentage de colorant par celui des macromolécules ; nous avons fait de même pour le DNA, le RNA et les protéines. Ainsi, nous avons obtenu une valeur relative "spécifique" en quelque sorte. Une déviation positive de l'unité désigne alors une teneur relativement élevée du composé étudié, une déviation négative une teneur basse. Les comparaisons des valeurs obtenues de cette façon pour le colorant et les macromolécules permettent d'établir une corrélation entre la distribution du colorant et celle d'une ou plusieurs espèces de macrpmolécules.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

ABSORPTION DES COLORANTS

Afin d'étudier l'absorption des colorants, nous avons utilisé 4 types d'expériences.

1) Absorption en fonction du temps

Nous avons incubé les cellules avec les colorants à des concentrations fixes, et nous avons déterminé la concentration du colorant dans le milieu et dans les cellules à des intervalles donnés. Nous avons ensuite établi des courbes de cinétique.

2) Absorption en fonction de la concentration du colorant

Nous avons incubé une concentration fixe de cellules avec des concentrations croissantes de colorant. Nous avons, à un temps correspondant au maximum d'absorption, déterminé la concentration du colorant dans le milieu et dans les cellules.

3) Absorption en fonction de la concentration de cellules

Nous avons incubé une concentration fixe de colorant avec des concentrations croissantes de cellules. Nous avons, après un temps correspondant au maximum d'absorption, déterminé la concentration du colorant dans le milieu et dans les cellules.

4) Absorption en fonction de la densité des cellules, le rapport c colorant/c cellules étant stable

Nous avons incubé un mélange de colorant et de cellules pendant 7 minutes, et nous avons déterminé la concentration du colorant dans le milieu et dans les cellules. Nous

avons ensuite centrifugéle mélange, et nous avons resuspendu les cellules dans du milieu neuf, leur concentration passant de 1 à 10 par rapport à la concentration originale. Nous avons incubé ces suspensions pendant un temps correspondant au maximum d'absorption, et nous avons déterminé après l'incubation, la concentration du colorant dans le milieu et dans les cellules.

Dans chaque série, à la fin des incubations, nous avons examiné les cellules au microscope.

NOTATIONS

Nous avons adopté les notations suivantes :

N = concentration des cellules

C_o = concentration initiale du colorant dans le milieu

C_t = concentration du colorant dans le milieu à l'instant t.

C_E = concentration du colorant dans le milieu à l'équilibre.

F_t = concentration du colorant dans les cellules à l'instant t.

F_E = concentration du colorant dans les cellules à l'équilibre.

F est composé de X. N et Y. N, colorant fixé respectivement en complexe 2 et en complexe 1 par cellule.

M_t = colorant disparu à l'instant t.

M_E = colorant disparu à l'équilibre.

M se déduit de C_o, C_E (ou C_t) et de F_t (ou F_E), il désigne la différence entre le colorant disparu du milieu et le colorant effectivement retrouvé dans les cellules. Il est composé de x N colorant disparu à partir du colorant fixé en complexe 2 et y N colorant disparu à partir du colorant fixé en complexe 1. Le volume est unitaire.

La concentration des cellules est exprimée en unités de 10^5 cellules/ml. La concentration des colorants est exprimée en unités D.O x 10^{-3} . Ces unités sont plus commodes à manier que des molarités ou des µgr. Connaissant le coefficient d'extinction molaire, il est facile de retrouver les molarités, respectivement les µgr/ml. A l'aide de la table de conversion ci-dessous, il est possible de transformer les unités D.O en quantités réelles.

Colorant	λ mμ	A	B	C	D	E
BT	630	$0,385 \times 10^5$	20,9	47,8	6,41	156
PF	443	$0,385 \times 10^5$	31,1	32,1	6,41	156
Py	545	$0,398 \times 10^4$	2,18	458,7	0,66	1515
AO	490	$0,129 \times 10^5$	7,07	141,4	2,15	465

avec :

A = Coefficient d'extinction molaire
B = 1 μgr/ml = unités D.O x 10^{-3}
C = 1 unité D.O = μgr/ml
D = 1 μM = unités D.O x 10^{-3}
E = 1 unité D.O = μM

Pour le BT et le PF, le coefficient d'extinction est le plus élevé, donc le plus favorable pour l'établissement d'une grande série de concentrations. Le BT a un avantage supplémentaire : les effets bathochromes et hypsochromes du colorant lié en complexe 1 et en complexe 2 provoquent des différences de couleur telles que leur distinction est facile au microscope. Pour ces raisons, nous avons choisi le BT comme colorant-témoin dans l'étude des lois d'absorption, et nous avons ensuite appliqué ces lois à d'autres colorants.

RESULTATS

1) Observations microscopiques

Les quatre colorants sont incorporés dans les cellules animales. La concentration dans le milieu diminue très rapidement, la concentration intracellulaire augmente. Il ne s'agit donc pas d'une diffusion simple, mais bien d'une fixation du colorant à l'intérieur des cellules.

Quand on suit l'incorporation du colorant au microscope, on constate, d'abord, une coloration de la membrane cellulaire, et une partie du colorant y reste fixée. Une autre partie se trouve peu à peu concentrée dans les vacuoles de potocytose, tandis que le cytoplasme se colore légèrement. Par la suite, le colorant pénètre dans le noyau, qui se colore fortement, en particulier les figures mitotiques. Dans le cas du BT, la membrane et le cytoplasme sont violets, couleur caractéristique du 2ème complexe, le noyau, et, en particulier, les figures mitotiques sont bleu-verts, couleur caractéristique du 1er complexe. Les vacuoles paraissent bleues ce qui indiquerait que le colorant inclus serait sous forme de colorant libre.

Quand on regarde un mélange colorant-cellules après un temps d'incubation suffisamment long pour l'établissement d'un équilibre, on voit des amas violets dans le cytoplasme à côté d'amas bleu-verts. Le noyau, quand il est coloré, apparaît bleu-vert ou bleu pâle. La prédominance d'une couleur est conditionnée par la concentration initiale des colorants et des cellules. Quand la concentration des colorants est faible par rapport à la concentration des cellules, la coloration violette prédomine. Quand elle est forte par rapport à la concentration des cellules, la couleur bleu-verte augmente.

Quand la concentration des cellules est faible, moins de cellules sont colorées que quand elle est élevée, la concentration de colorant/cellule étant stable.

Dans tous les cas, la coloration des cellules est hétérogène. On trouve simultanément une partie des cellules fortement colorées, une partie incolore, et tous les intermédiaires. En général, les petites cellules récemment issues de la mitose sont plus fortement colorées que les grandes cellules plus anciennes. Il en résulte que les expériences qui portent sur une suspension de cellules ne sont valables, que pour une population donnée de cellules, et ne peuvent être extrapolées au niveau d'une cellule individuelle.

2) Cinétique

Les résultats des expériences de cinétique sont résumés dans la figure 1. On voit que l'absorption est très rapide, sans que l'on puisse déceler un temps de latence. Par la suite, un équilibre est atteint, qui reste stable pendant plusieurs heures. Mais si F est sensiblement le même que $C_o - C_t$ au début de l'expérience, il en est autrement quand l'équilibre est atteint. Un décalage s'établit entre le colorant abosrbé et le colorant effectivement fixé. Une partie du colorant ou tout au moins ses groupements chromatophores sont détruits au cours de l'incubation.

3) Concentration du colorant et des cellules

Des résultats des expériences portant sur la variation de la concentration des cellules et du BT sont portés dans le tableau 1 à titre d'exemple.

On remarque que C_E augmente quand C_o augmente tant que N est petit. Quand N est grand, C_E est invariable.

Quand N augmente, C_o étant fixe, C_E diminue régulièrement jusqu'à un N limite et devient ensuite invariable ;

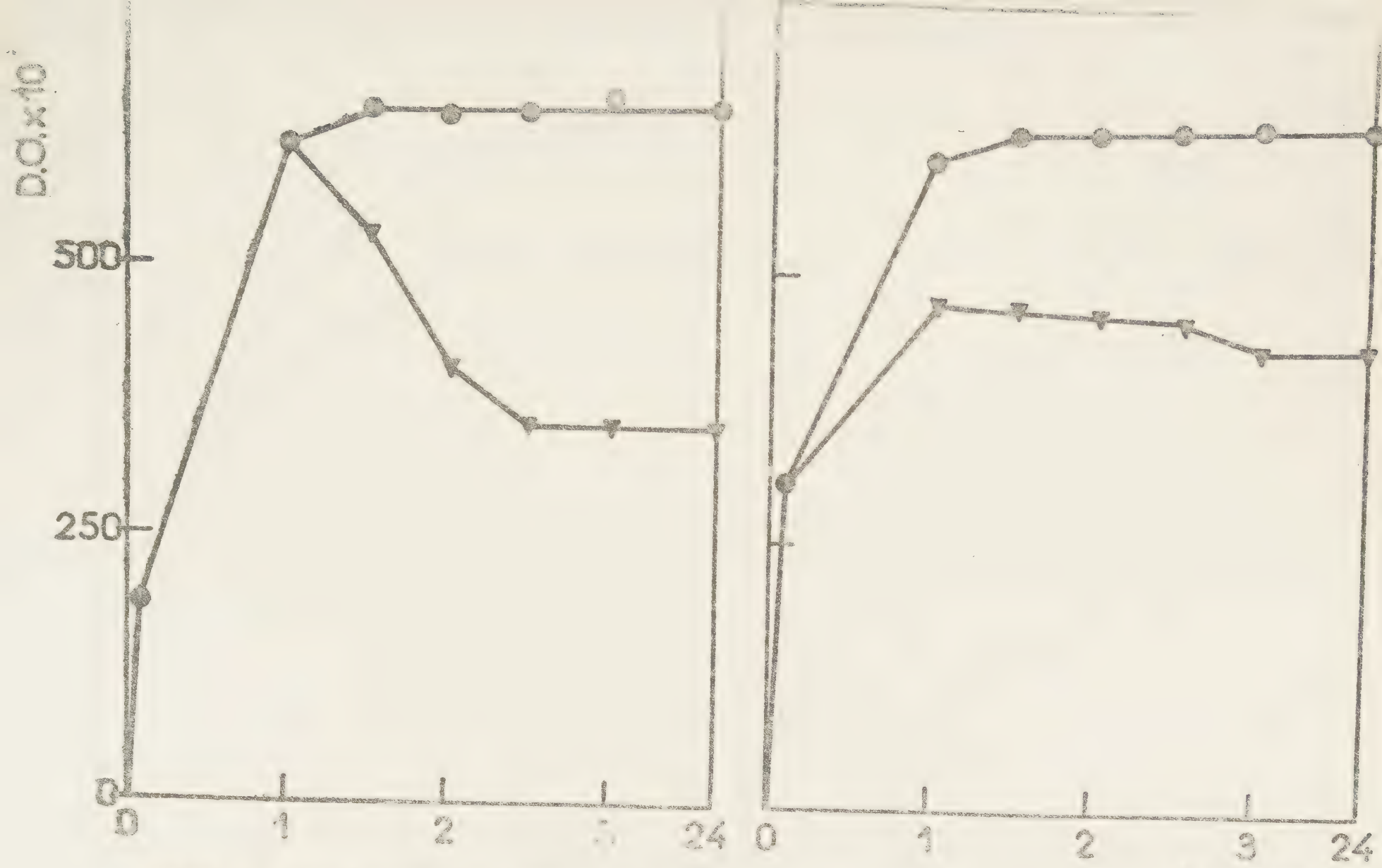


Figure 1. Etablissement de l'état [illegible] dans cette une suspension de cellules [illegible] (a) et [illegible] (b).

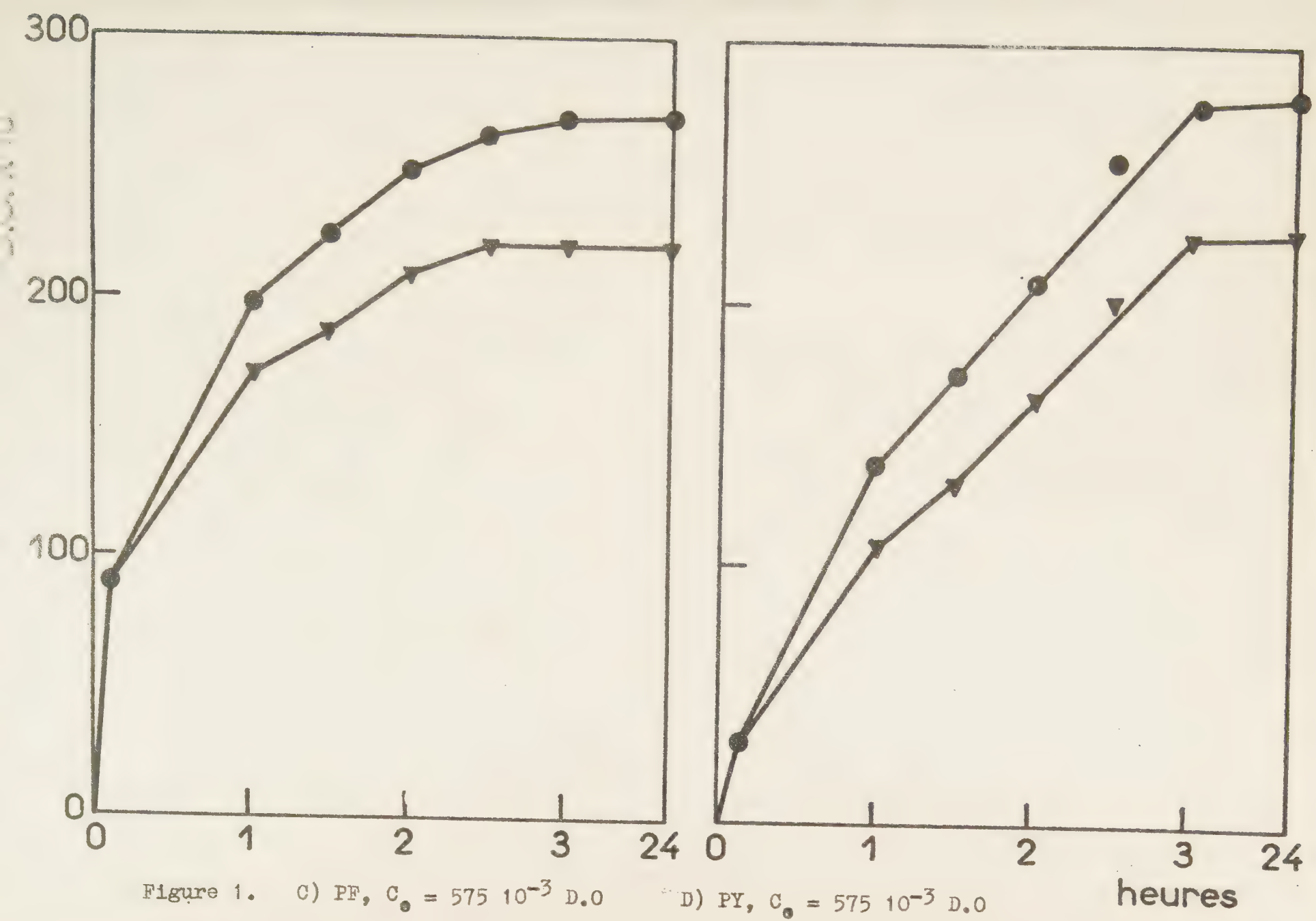


Figure 1. C) PF, C_o = 575 10^{-3} D.O D) PY, C_o = 575 10^{-3} D.O

TABLEAU 1

Expérience type 2 (cellules de Krebs - BT)

N/Co	5/225	5/457	5/920	5/1163	50/225	50/457	50/690	50/920	50/1163
CE	102	205	501	652	81	53	50	54	60
FE	91	169	273	293	145	360	553	774	1000
x + y	18	37	54	58	2,9	7,2	11,0	15,4	20
ME	32	83	146	218	0	44	87	92	103
x + y ME/N	6,4	16,6	29,2	43,6	0	0,8	1,7	1,8	2,0

TABLEAU 1

Expérience type 3 (cellules de Krebs - BT)

N/Co	5/1100	10/1100	15/1100	20/1100	25/1100	30/1100	35/1100	40/1100	45/1100	50/1100
CE	305	173	140	87	81	51	60	56	64	56
FE	320	532	740	688	889	789	820	824	821	824
x + y	64	53	49	34	35	26	23	20	18	16
ME	475	395	220	325	130	260	220	220	215	220
x + y ME/N	95	39	14	16	5	8	6	5	4	4

T A B L E A U 1

N/Co	5/117	10/354	15/581	20/708	25/885	30/1062	35/1239	40/1416	45/1593	50/1770
CE	92	95	100	113	105	102	104	98	99	99
FE	48	142	223	366	414	710	816	990	1065	1277
X + Y	9,6	14,2	14,8	18,3	16,5	23,6	23,3	24,7	23,6	25,5
ME	37	117	20,8	22,9	37,6	250	319	328	429	394
X + Y	7,5	11,7	13,8	11,4	14,6	8,3	9,1	8,2	9,5	7,8

Expérience type 4 (cellules de Krebs - BT)

la valeur numérique de C_E est alors la même que celle observée dans l'expérience du type 1 (cinétique).

Dans les expériences du type 4, quand N/C_o est stable, C_E est invariable. Sa valeur numérique est plus grande que dans les expériences de type 2 et 3. Nous avons pu constater que cette augmentation de C_E est une conséquence de la centrifugation des cellules contenant le colorant ; elle se produit aussi bien après une resuspension des cellules dans le milieu initial que dans du milieu neuf.

F augmente régulièrement quand C_o augmente. Quand N augmente, C_o étant fixe, F augmente jusqu'à un F limite. Dans les expériences du type 4, F augmente quand N et C_o augmentent.

On constate de nouveau un décalage entre F et $C_o - C_E$, N est donc plus grand que O. M augmente quand C_o augmente. Il est plus grand quand N est petit. Dans les expériences du type 3, M diminue quand N augmente et atteint une valeur limite. Dans les expériences du type 4, M augmente quand C_o et N augmentent. Cette augmentation devient moins grande, quand N est plus grand que 20×10^5 . L'absorption dépend donc d'une série de facteurs autres que C_o et N.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats obtenus avec une population de cellules mettent deux phénomènes en évidence.

1) Une partie du colorant est détruite par les cellules. Cette destruction peut être attribuée à une activité des enzymes mitochondriales (111). Ces enzymes sont abondants dans le cytoplasme, mais ne se trouvent pas dans le noyau. On s'attendrait donc à une destruction du colorant fixé dans le cytoplasme (surtout en complexe 2) tandis que le colorant fixé (en complexe 1) dans le noyau y échapperait. Bien qu'il nous a pas été possible de caractériser et de doser ces produits de dégradation, il est logique de supposer qu'un équilibre s'établit entre la concentration intracellulaire et la concentration extracellulaire des produits de dégradation des colorants.

2) Quand le mélange colorant-cellules est en équilibre, une fraction mesurable et toujours constante de colorant persiste dans le milieu, quelle que soit la concentration des cellules. On n'est donc pas en présence d'un équilibre simple, entre le colorant libre et le colorant lié, ce dernier étant fixé sur un ou plusieurs sites d'une même macromolécule ou sur différents sites de différentes macromolécules. Si tel était le cas, la concentration du colorant dans le milieu diminuerait progressivement quand la concentration du colorant dans les cellules augmente. Pour que la concentration du colorant dans le milieu soit invariable, la concentration de colorant intracellulaire avec laquelle l'équilibre s'établit doit être également invariable. Cette condition est satisfaisante, si on admet une première fixation du colorant en complexe 2, correspondant à un certain degré de saturation. Tant que ce seuil de saturation n'est pas atteint, le colorant ne se fixe pas ou très peu en complexe 1. Quand ce seuil est dépassé, le

colorant supplémentaire est fixé en complexe 1 et en complexe 2, jusqu'à ce que les sites des deux complexes soient saturés. Un équilibre s'établit alors entre le colorant fixé en complexe 1 et celui fixé en complexe 2 ; le colorant fixé en complexe 1 n'étant pas en équilibre avec le colorant du milieu, mais avec le colorant dans le cytoplasme.

Les observations microscopiques montrent que les cellules fixent le colorant en complexe 1 et en complexe 2. La fixation en complexe 2 est préférentielle tant que la concentration du colorant est faible par rapport à la concentration des cellules. D'après les données connues, la localisation de ces complexes était prévisible ; le complexe 2 se trouve surtout associé à la membrane qui contient mucopolysaccharides et protéines et au cytoplasme qui contient protéines et RNA. Le complexe 1 se trouve surtout dans le noyau qui contient le RNA et les nucléoprotéines qui lui sont associées, mais aussi dans le cytoplasme. Le complexe 1 cytoplasmique correspond probablement à du colorant fixé par le RNA en complexe 1. Ces considérations nous ont amenés à établir un modèle mathématique dont on trouve le schéma dans la figure 2.

Ce shéma prévoit deux compartiments dans chaque cellule. Le premier correspond au cytoplasme et contient surtout des sites de complexe 2 : mucopolysaccharides, protéines et RNA monocaténaire. Nous avons désigné le colorant qui y est fixé par le symbole x. On y trouve aussi un nombre relativement faible de sites du complexe 1 correspondant au RNA de structure hélicoïdale. Le colorant qui y est fixé est désigné par le symbole y. Le deuxième compartiment correspond au noyau et contient surtout des sites du complexe 1, fournis par le DNA nucléaire. Le colorant qui y est fixé est aussi désigné par le symbole y. Un nombre relativement plus faible de sites du complexe 2 qui correspondent aux nucléoprotéines peuvent s'y trouver. Le premier compartiment est en équilibre avec le milieu

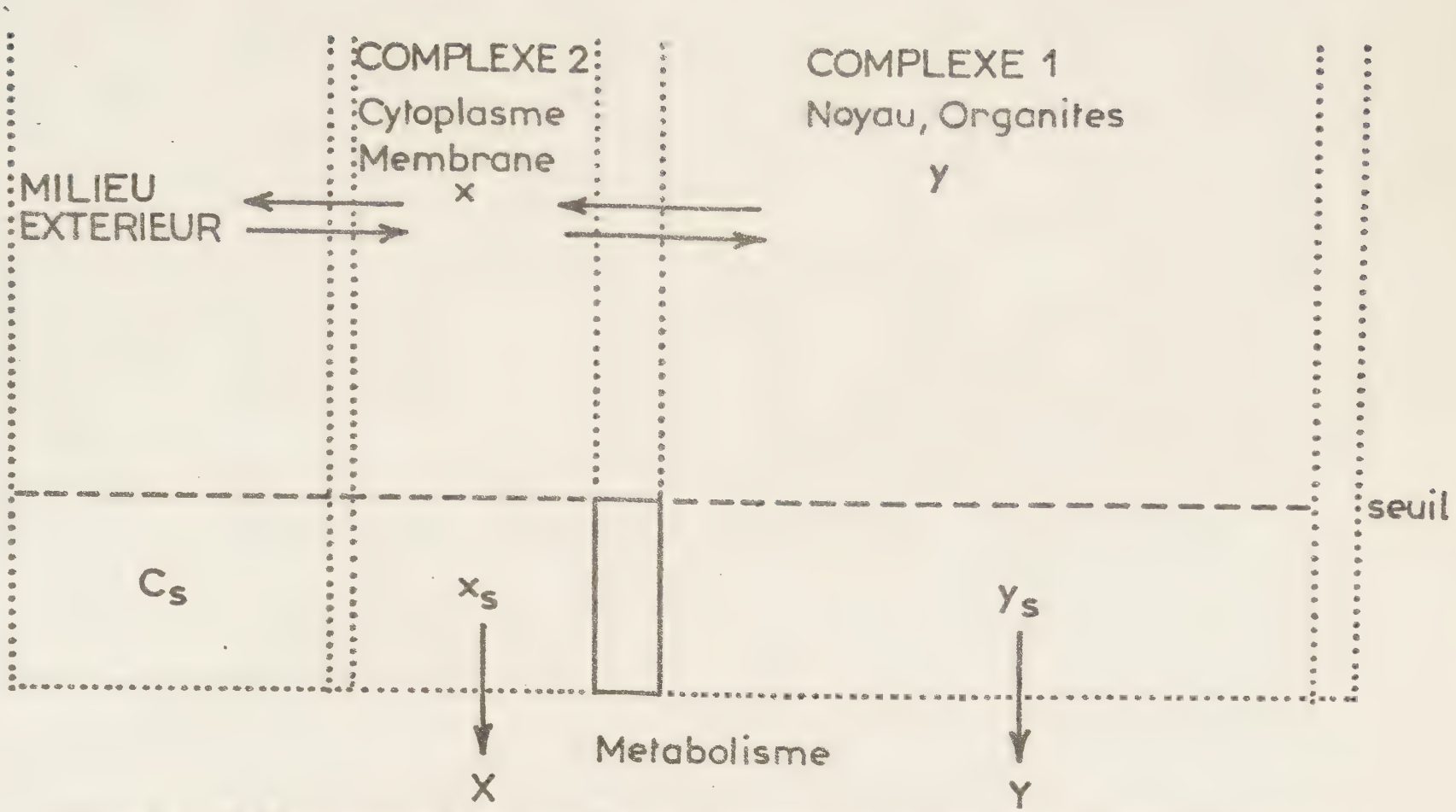


Figure 2. Schéma général du modèle de l'absorption du colorant par les cellules animales vivantes.

et avec le deuxième compartiment, le deuxième compartiment est en équilibre avec le premier, mais non pas avec le milieu extérieur. Il existe une barrière entre les deux compartiments : elle est constituée par certains sites cytoplasmiques, qui sont saturés préférentiellement. Tant que ces sites ne sont pas saturés, le colorant ne peut pénétrer dans le deuxième compartiment. Nous avons décrit ces sites par le symbole x_s .

La quantité de colorant détruit par cellule à partir du complexe 1 est désignée par la lettre Y, celle détruite à partir du complexe 2 est X. Un équilibre s'établit entre la concentration X + Y intracellulaire et la concentration X + Y dans le milieu.

Les lois de passage applicables à ce modèle peuvent alors être décrites comme suit.

$$dx = K\,(C - mx)\,dt - dx - dy \qquad (1)$$

(1) exprime le passage du colorant du milieu vers le cytoplasme et vice versa, m désigne la résistance de la cellule à la pénétration du colorant.

$$dy = k' \left| (x - x_s)^{*} - t\,(y - y_s)^{**} \right| dt - dy \qquad (2)$$

(2) exprime le passage du colorant du cytoplasme vers le noyau. Il va du colorant lié en complexe 2 en colorant lié en complexe 1, et n'a lieu que si x est supérieur à un seuil x_s. Il n'y a résistance que si y dépasse la valeur y_s correspondant à x_s. (c'est-à-dire, la valeur maximale que peut prendre y_s si $x = x_s$).

* si $x - x_s > 0$, sinon 0
** si $y - y_s > 0$, sinon 0

$$dX = k'' \,(\, ix - NX)\,dt \qquad (3)$$

(3) exprime la loi du métabolisme à partir du complexe 2, qui a lieu essentiellement dans le cytoplasme. La quantité métabolisée dépend de la quantité fixée x_t, mais aussi de la quantité

totale déjà métabolisée par l'ensemble des cellules. La capacité des cellules à détruire le colorant lié en complexe 2 dans le cytoplasme est désignée par le coefficient i.

$$dY = k''' (jy - Y)\, dt \qquad (4)$$

(4) exprime la loi du métabolisme du colorant lié en complexe 1, qui dépend de la quantité de colorant fixé en complexe 1 y_t et de la quantité déjà métabolisée Y_t. La capacité des cellules à détruire le colorant lié en complexe 1 est désignée par le coefficient j.

Etude de la distribution du colorant à l'équilibre au cours des expériences de type 2 et 3

A l'équilibre, toutes les différentielles sont nulles, on a donc :

$$C_E = n\, x_E \qquad (5)$$

$$i\, x_E = N\, X_E \qquad (6)$$

$$j\, y_E = Y_E \qquad (7)$$

et, selon les cas, soit

$$\text{(fig. } 3_1\text{)} \quad x_E < x_s \quad \text{et} \quad y_E < y_s \qquad (8_1)$$

$$\text{(fig. } 3_2\text{)} \quad x_E = x_s \quad \text{et} \quad y_E < y_s \qquad (8_2)$$

$$\text{(fig. } 3_3\text{)} \quad x_E = x_s \quad \text{et} \quad y_E = y_s \qquad (8_3)$$

$$\text{(fig. } 3_4\text{)} \quad x_E > x_s \quad \text{et} \quad y_E > y_s \qquad (8_4)$$

dans les cas (3_3) et (3_4), $x_E - x_s = t\,(y_E - y_s)$ (9)

Enfin, $C_E = C_o - N\,(x_E + X_E + y_E + Y_E)$ (10)

Une illustration de ces différents cas se trouve dans la figure 3.

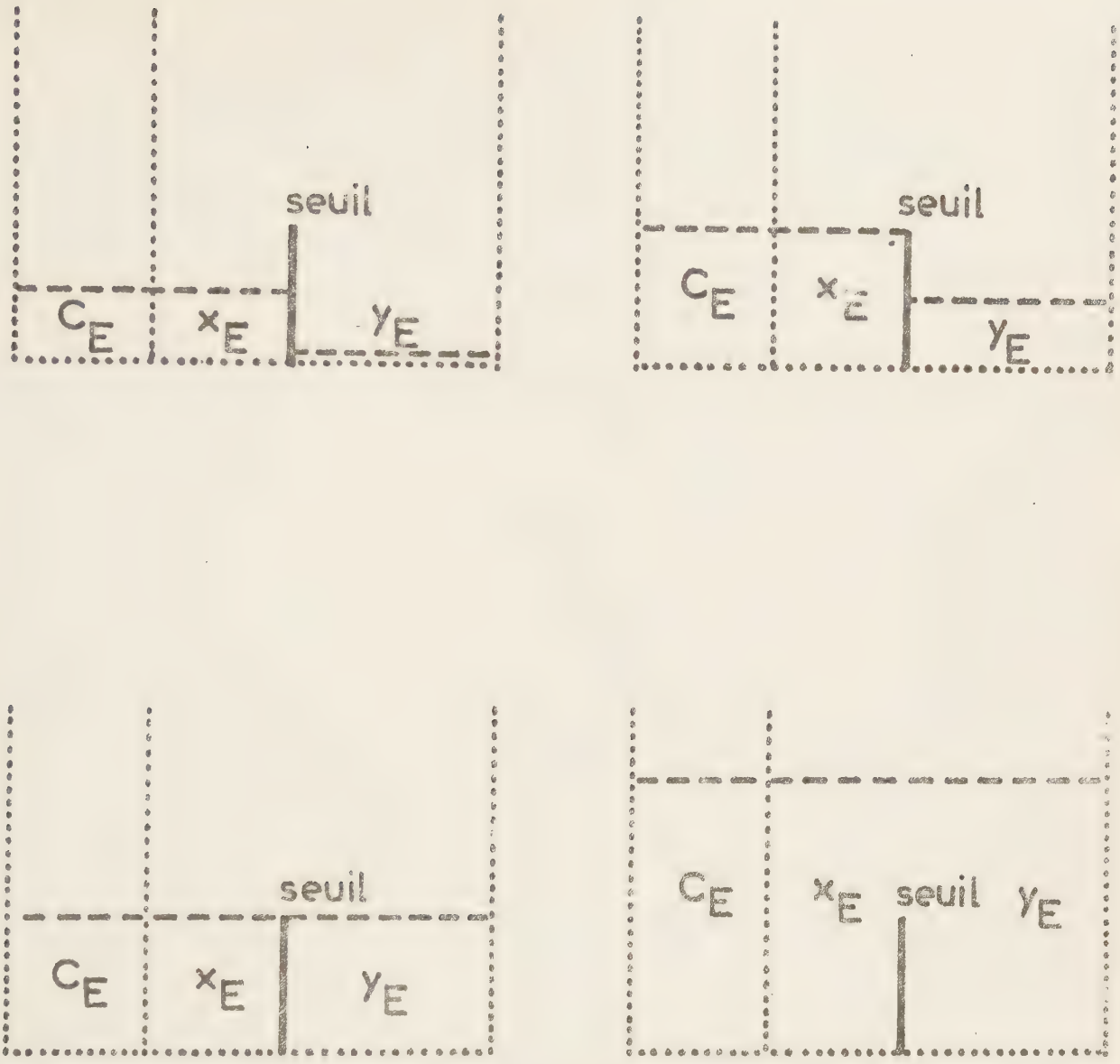


Figure 3. Schéma des différents états finaux possibles, à l'équilibre.

Les termes directement mesurables sont : N, C_o , C_E et F_E $= N (x_E + y_E)$. En remplaçant dans (10) X_E et Y_E par la valeur tirée de (6) et (7) on a :

$$C_E = C_o - N \left(x_E + \frac{i}{N} x_E + y_E + j y_E\right)$$

et en remplaçant y_E par $\frac{F_E}{N} - x_E$

$$C_E = C_o - (N + i) x_E - N(1 + j)\left(\frac{F_E}{N} - x_E\right)$$

$$C_E = C_o + (Nj - i) x_E - (1 + j) F_E$$

soit encore en remplaçant x_E par $\frac{C_E}{m}$ d'après (5)

$$C_o - C_E \left(1 + \frac{i - Nj}{m}\right) - (1 + j) F_E = 0 \qquad (11)$$

a) Variations de C_E avec C_o (expériences du type 2)

La figure 4 montre les variations de C_E en fonction de C_o , telles qu'on les déduit du modèle.
Quand C_o croît à partir de 0, on sature d'abord certains sites de complexe 2 dans le cytoplasme, jusqu'à ce que $x_E = x_s$ (c'est-à-dire que $C_E = C_s$). On aboutit à un plateau qui persiste tant que y_E n'atteint pas y_s. Ce plateau est d'autant plus décalé vers la droite que N est plus grand. Il y a enfin une augmentation linéaire (avec une pente plus faible que la première fois). Nous appelons les limites du plateau C_1 et C_2.

b) Variations de F_E en fonction de C_o.

Quand on considère le plateau de la figure 4, on trouve $C_E = C_s$
D'après (11), F_E et C_o sont alors liés par une relation linéaire qu'on peut écrire :

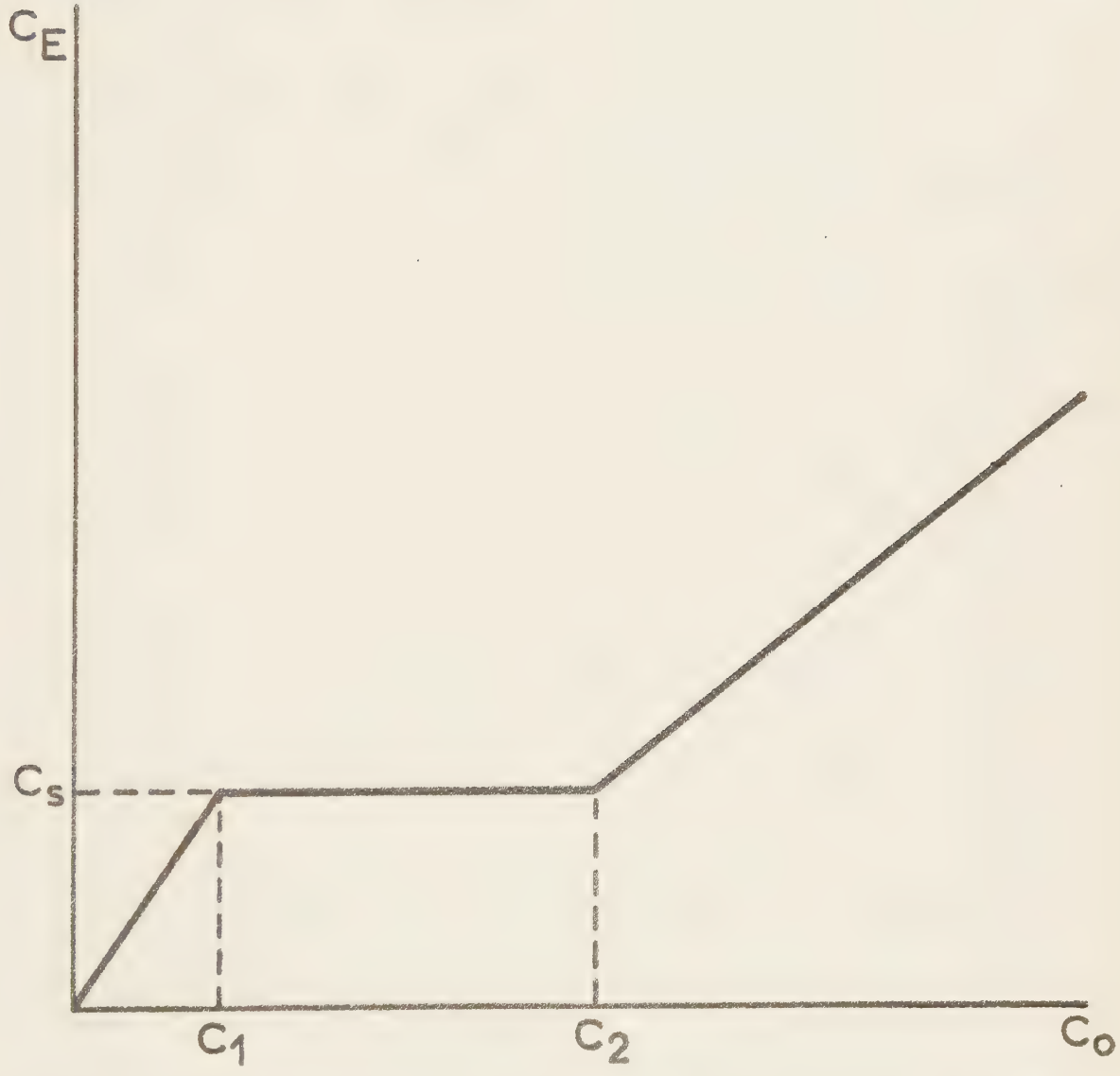


Figure 4. Concentration finale du colorant dans le milieu en fonction de sa concentration initiale (concentration fixe de cellules). Courbe déduite du modèle.

$$F_E = \frac{1}{1 + j} C_o - \frac{C_s}{1 + j} \left(1 + \frac{i - Nj}{m}\right) \qquad (12)$$

d'où la figure 5 représentant une droite.
La pente de cette droite fournit une estimation de j et son ordonnée à l'origine une estimation de $\frac{i - Nj}{m}$ (étant entendu que Nj est connu).

Quand C_o tend vers 0, la formule (12) n'est pas valable, car $C_E < C_s$.

Cette partie de la courbe correspond à la courbe en pointillés dans la figure 5. Quand on considère la courbe de la figure 4 au-delà du plateau, on peut écrire $C_E = h\, C_o - h'$ (13), et en portant cette expression dans l'équation 11, on a :

$$(13) \qquad C_o \left[1 - h \left(1 + \frac{i - Nj}{m}\right)\right] + h' \left(1 + \frac{i - Nj}{m}\right) = (1 + j) F_E$$

$$F_E = \frac{1 - h \left(1 + \frac{i - Nj}{m}\right)}{1 + j} C_o + h' \left(1 + \frac{i - Nj}{1 + j}\right) \qquad (14)$$

La figure 6 représente la courbe déduite de l'équation (14), la figure 6a représente les résultats expérimentaux indiqués dans le tableau 1, portés dans l'équation (14). L'allure des courbes dans les deux figures est identique.

<u>Estimation des coefficients d'après les résultats expérimentaux.</u>
<u>Expérience type 2</u>

N = 50, la pente de la courbe $F_E = f(C_o)$ donne $\frac{1}{1 + j}$ = 0,92, d'où j = 0,087 et l'ordonnée à l'origine

$$\left(1 - \frac{50 \times 10^5 \times 0{,}087 - i}{m}\right) = \frac{65}{55 \times 0{,}92} = 1{,}27$$

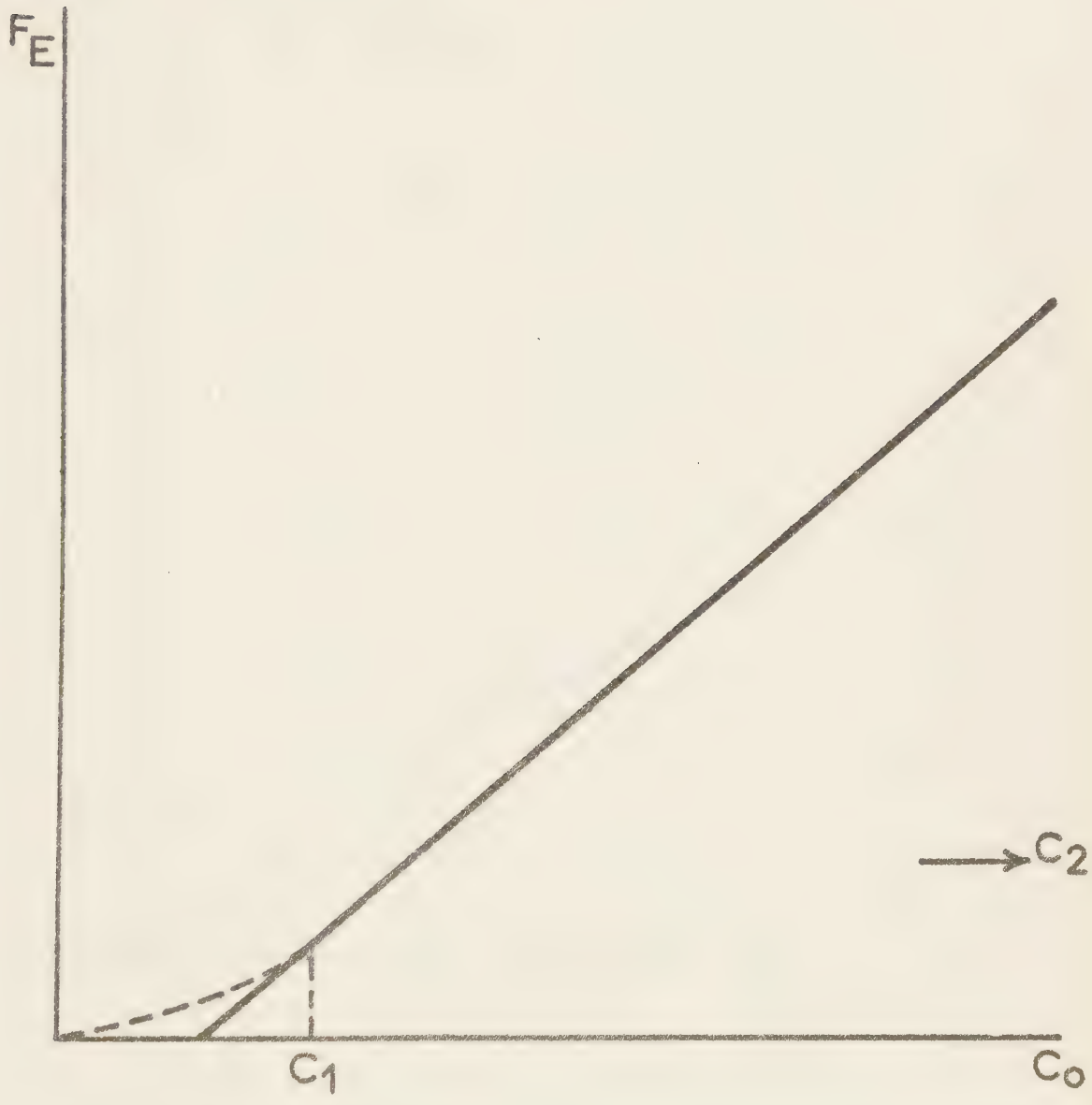


Figure 5. Concentration finale du colorant dans les cellules en fonction de sa concentration initiale dans le milieu (concentration fixe de cellules) la concentration finale du colorant dans le milieu correspond au plateau $C_1 - C_2$. Courbe déduite du modèle.

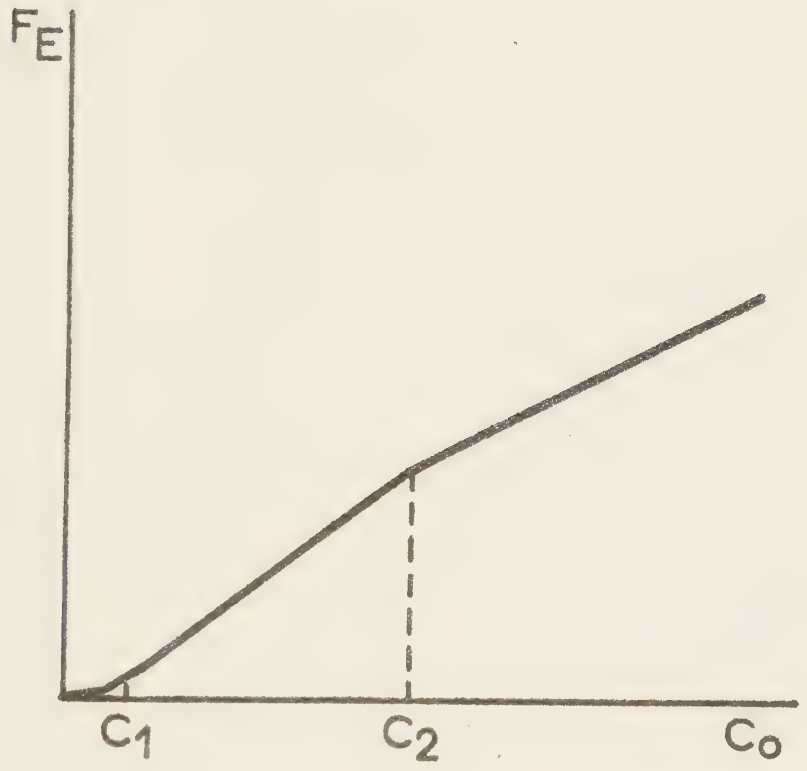


Figure 6. Concentration finale du colorant dans les cellules en fonction de sa concentration initiale dans le milieu (Concentration fixe de cellules). Courbe déduite du modèle.

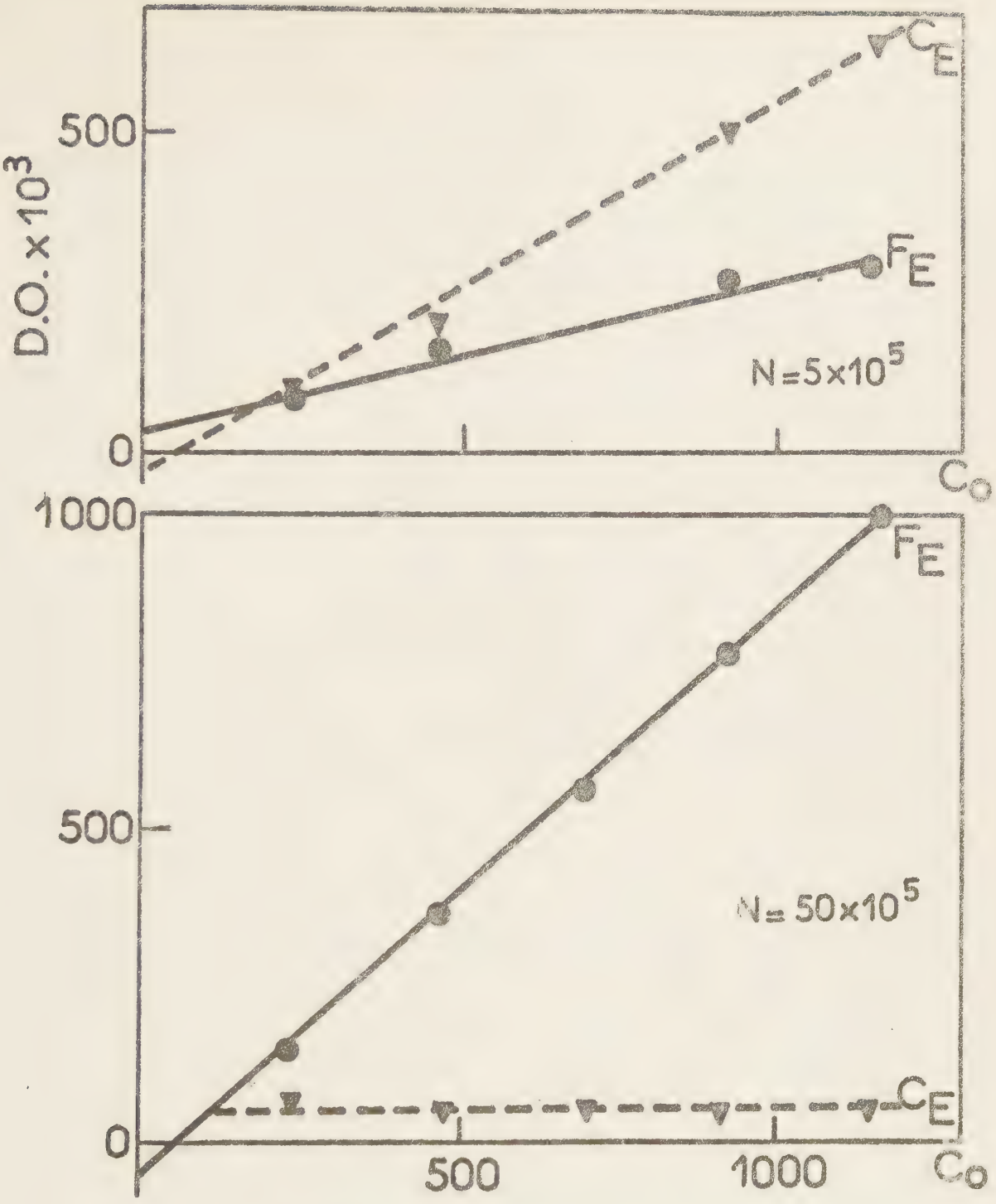


Figure 6 a. Concentration finale du colorant dans le milieu (▼) et dans les cellules (●—) en fonction de sa concentration initiale
En haut : N = 5.10^5 cellules/ml $C_E > C_s$;
En bas : N = $50\ 10^5$ cellules/ml $C_E^s = C_s$

Voir tableau 1, expérience type 2

N = 5 en confrontant avec (13) h = 0,59 et h' = 35 et en confrontant les résultats à (14), la pente est

$$\left[1 - 0{,}59\left(1 - \frac{5 \times 10^5 \times 0{,}087 - i}{m}\right)\right] 0{,}92 = 0{,}23$$

d'où $$\left(1 - \frac{5 \times 10^5 \times 0{,}087 - i}{m}\right) = 1{,}27$$

Rappelons que N exprime la concentration des cellules, divisé par 10^5 et l'ordonnée à l'origine

$$35\left(1 - \frac{5 \times 10^5 \times 0{,}087 - i}{m}\right) = 45$$

d'où $$\left(1 - \frac{5 \times 10^5 \times 0{,}087 - i}{m}\right) = 1{,}29$$

La parenthèse a donc la même valeur, qu'on y fasse intervenir $N = 5 \times 10^5$ ou $N = 50 \times 10^5$. Le terme 0,087 N est donc négligeable devant i. On a alors

$$\frac{i}{m} = 0{,}27$$

Les équations s'écrivent finalement, en posant $\frac{i}{m} = I$, plus simplement :

$$C_o - C_B(1 + I) - (1 + j) F_E = 0 \qquad (11 \text{ bis})$$

soit si

$$C_E = C_s,\ F_E = \frac{1}{1 + j} C_o - \frac{C_s}{1 + j}(1 + I) \qquad (12 \text{ bis})$$

et si

(14 bis) $$C_E = h C_o - h',\ F_E = \frac{1 - h(1 + I)}{1 + j} C_o + h'(1+I)$$

Soulignons que si la capacité des cellules à métaboliser le colorant à partir du complexe 1 est négligeable par rapport à la capacité des cellules à métaboliser le colorant à partir

du colorant fixé en complexe 2 , elle n'est cependant pas nulle.

Expérience type 3

La figure 7 illustre les variations de C_E en fonction de N quand C_o est fixe, telle qu'on la déduit théoriquement et la figure 7a est basée sur les valeurs expérimentales (tableau 2, expérience type 3). L'allure des deux courbes est la même ; on peut donc chercher une solution graphique de l'équation (11 bis), par exemple, en cherchant si les droites d'équation $f(I) = \frac{C_o}{F_E} - \frac{CE}{FE}(1 + I)$ sont concurrentes en un point qui a comme coordonnées $(1 + I)$, $(1 + j)$

Tel est bien le cas, et on trouve ainsi les valeurs I = 1,7 et j = 0,16.

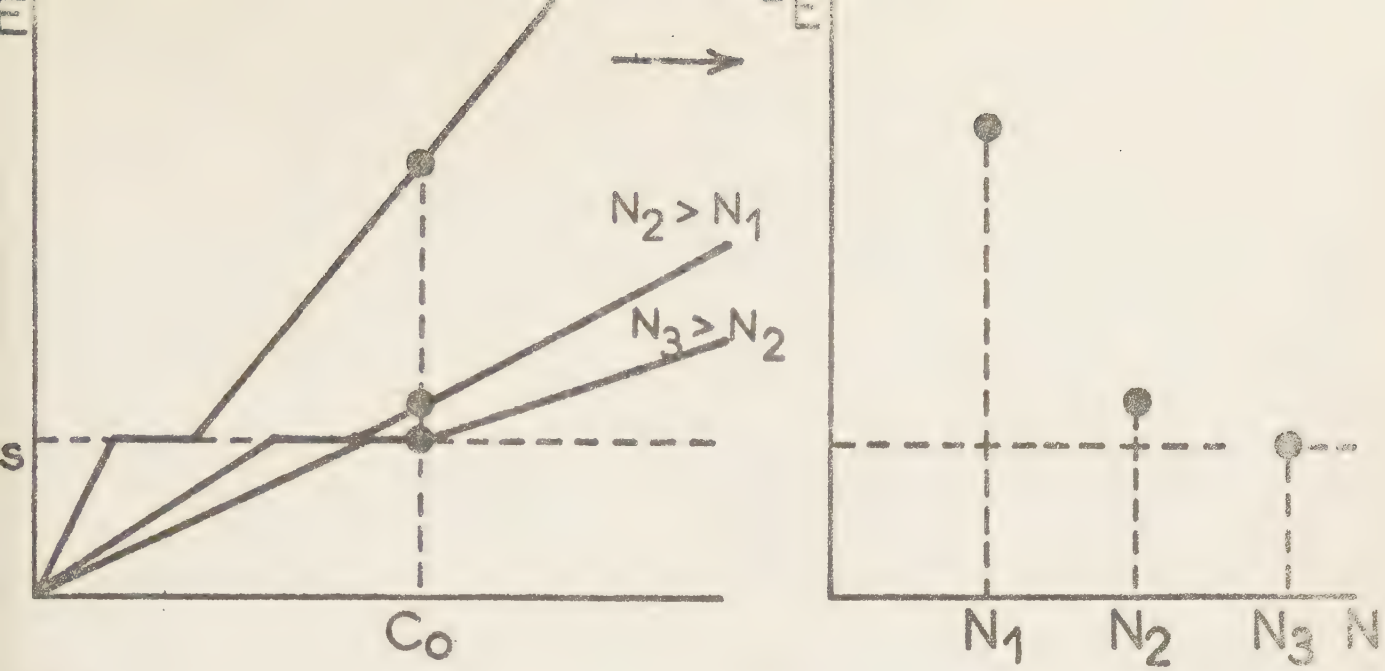
Expérience type 4

Lorsqu'on compare les résultats relatifs à l'expérience des types 2 et 3 avec ceux du type 4, on s'aperçoit que le plateau C_s est de 55 pour les premiers, et de 105 pour le dernier type d'expérience.

D'après les résultats expérimentaux discutés précédemment, ce phénomène serait dû à une lésion de la membrane cellulaire au cours de la centrifugation des cellules contenant déjà du colorant. Le milieu n'intervient certainement pas car on observe la même valeur de 105 quand on resuspend les cellules dans du milieu neuf ou dans le milieu initial contenant le colorant.

Nous admettrons donc, dans la suite de l'analyse, que le phénomène peut se traduire par une modification de I, mais non de j. Si x_s ne change pas, il faut que m soit multiplié par

$$\frac{105}{55} = 2 \text{ environ}$$



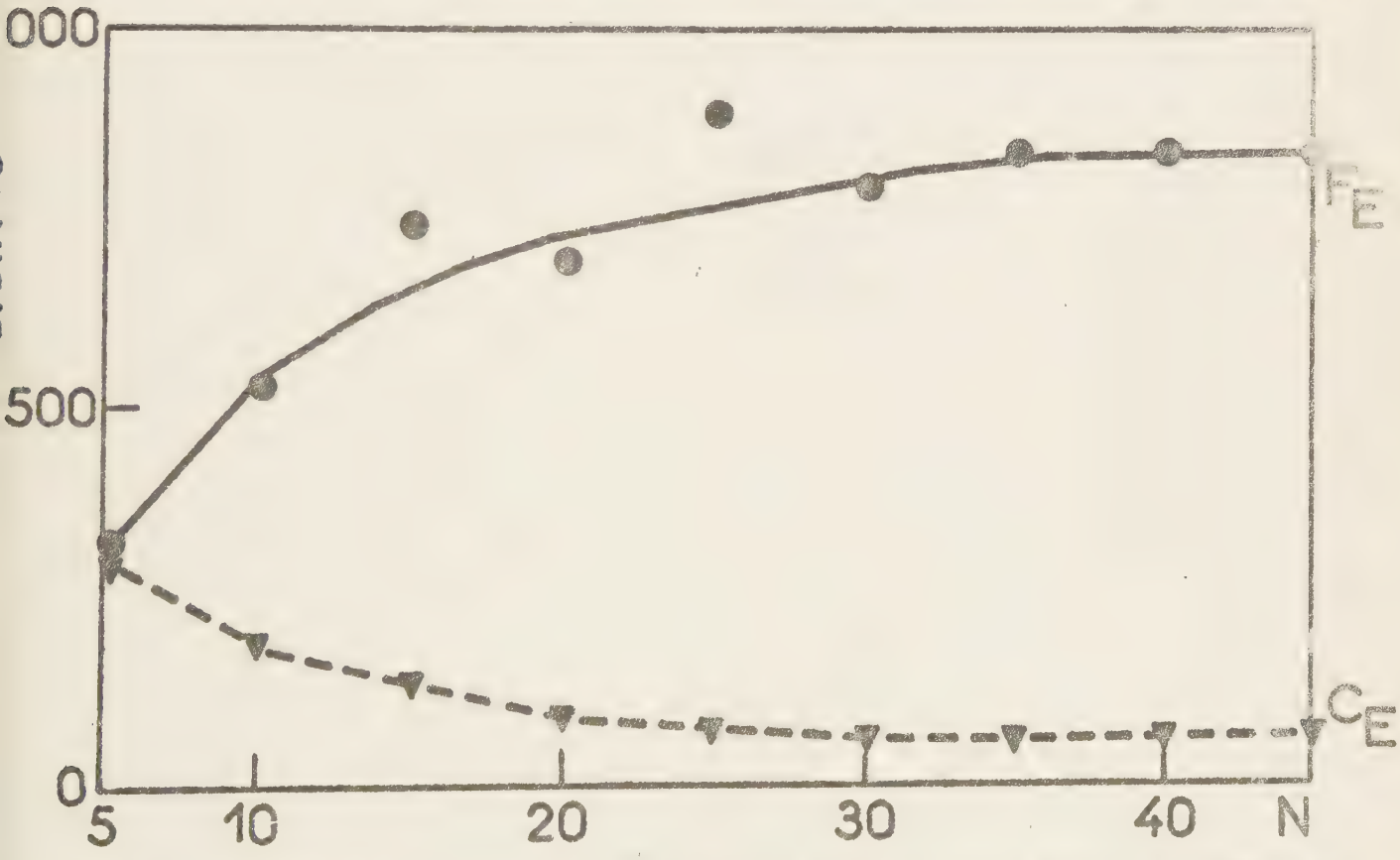


Figure 7. Gauche : Concentration finale du colorant dans le milieu en fonction de sa concentration initiale. Chaque série de droites correspond à une concentration de cellules. Droite : Concentration finale du colorant dans le milieu en fonction de la concentration de cellules (C_o fixe). Courbes déduites du modèle

Figure 7 a. Concentration finale du colorant dans le milieu (▼) et dans les cellules en fonction de leur concentration. Voir tableau 1. Expérience Type 3.

A l'équilibre, les relations (5) et (9) restent vraies, par contre l'équation (10) devient :

$$C_E = N \left[x_1 + y_1 - (x_E + X_E + y_E + Y_E) \right] \qquad (15)$$

en appelant x_1 et y_1 les quantités initiales par cellules au moment de la resuspension dans du milieu neuf. Portant $N (x_1 + y_1) = F_1$ on a donc, de façon analogue à (11 bis)

$$F_1 - C_E (1 + I) - (1 + j) F_E = 0 \qquad (15 \text{ bis})$$

Expérimentalement, I et j sont alors les mêmes que dans l'expérience du type 3.
Comme nous l'avons montré au cours de la construction du modèle, ce modèle fournit actuellement la meilleure interprétation des faits expérimentaux.

ERREUR EXPERIMENTALE

Dans les expériences portant sur un matériel biologique, l'erreur expérimentale prend 2 aspects. Le premier concerne la précision des mesures. Elle dépend de l'appareillage utilisé et ne varie donc pas au cours des expériences.

Le deuxième concerne la reproductibilité des expériences. Elle dépend du matériel biologique qui peut être sujet à des variations assez importantes, en particulier, dans le cas des cellules animales.

Nous avons déterminé séparément, la précision des mesures et la reproductibilité des expériences. La précision des mesures a été déterminée à l'aide de plusieurs séries de C_s par la méthode du χ^2 . Nous avons résumé les résultats dans le tableau 2. On voit que l'erreur moyenne varie entre 0,6 % et 4 %, elle est d'autant plus faible que la D.O est plus grande, ceci étant vrai jusqu'à la valeur D.O = 0.8. Nous avons donc dilué les échantillons fortement colorés afin de pouvoir mesurer des D.O comprises entre 0,05 et 0,8.

Les chiffres se rapportant aux reproductibilités des expériences figurent dans le tableau 3.

Nous représentons plusieurs expériences faites avec des cellules d'ascite de Krebs en suspension et le BT. On voit que F_E varie beaucoup, bien que C_o et N soient les mêmes quand les cellules proviennent de lots différents. Or , F_E dépend de M_E , qui désigne la quantité de colorant métabolisée et tout métabolisme dépend de l'ensemble des activités métaboliques, donc de l'état physiologique des cellules, qui, à son tour, dépend de nombreux facteurs difficilement contrôlables.

Par contre, les expériences faites avec le même lot de cellules fournissent des résultats identiques, aux précisions

T A B L E A U 2

Cs moyen	Ecart moyen	U.D.O. x 10^{-3}	Ecart moyen	Erreur moyenne
57 (5 valeurs)	± 4	100	± 4	4 %
101 (9 valeurs)	± 4	200	± 4	2 %
95 (5 valeurs)	± 5	300	± 4	1,3 %
81 (4 valeurs)	± 3	400	± 4	1 %
28 (6 valeurs)	± 6	500	± 4	0,8 %
34 (5 valeurs)	± 4	600	± 4	0,6 %

T A B L E A U 3

Cellules de Krebs - BT -

Lot des cellules	N	C_o	FE	Moyenne	Ecart	%
A	50	900	687	681	+ 6	+ 0,8
A	50	900	675		- 6	- 0,8
A	50	900	691		+ 10	+ 1,4
A	50	900	671		- 10	- 1,4
B	50	1100	824	912	- 88	- 9,6
C	50	1100	1000		+ 88	+ 9,6
D	20	812	745	680	+ 65	+ 9,5
E	20	812	505		-175	- 25,7
F	20	812	790		+110	+ 10,6
G	10	812	766	523	+243	+ 46,4
H	10	812	280		-243	- 46,4

de mesure près. Par conséquent, on ne pourra comparer que les expériences faites avec un même lot de cellules.

Toutefois, les variations observées entre les différents lots de cellules ne constituent pas une erreur expérimentale proprement dite, mais l' expression d'un phénomène biologique que nous nous proposons d'étudier ultérieurement.

LIMITES PRATIQUES DES EXPERIENCES

Théoriquement, il aurait été utile d'étudier les courbes correspondant au modèle mathématique dans toute leur étendue pour chaque colorant.
En pratique, ces expériences ne sont réalisables que dans certaines limites.

1) Concentration des colorants : la valeur du coefficient d'extinction molaire détermine la limite inférieure de la mesure de concentration des colorants au spectrophotomètre, leur solubilité dans le milieu, la limite supérieure.

2) Concentration des cellules : la limite inférieure est donnée par la possibilité de sédimenter les cellules sans les léser. A des concentrations plus faibles que 2×10^5 cellules/ml, une centrifugation de 5 minutes à 5000 t/min, ne suffit pas pour sédimenter la totalité des cellules. La limite supérieure est déterminée par le volume des cellules ; à partir de 3000×10^5 cellules/ml, on est en présence d'une masse solide ; déjà à partir de concentrations de 150×10^5 cellules/ml, il devient impossible de prélever des aliquots homogènes.

3) Toxicité : Quand la concentration du PF et du BT tendent vers 10 µgr/ 10^5 cellules, celle du Py et de l' AO vers 20 µgr/10^5 cellules, les cellules s'agglomèrent ce qui rend la détermination de F et, par conséquent de M, aléatoire. Des aggrégats de ce genre s'observent indépendamment des colorants chaque fois que les cellules sont intoxiquées. On les observe quand le milieu est insuffisant ou quand il contient un poison cellulaire quelconque.

COMPARAISON DES COLORANTS

Les expériences qui ont servi à la mise au point du modèle ont été faites exclusivement avec les cellules d'ascite de Krebs et avec le BT.

Dans la figure 8, nous montrons les courbes correspondant à des valeurs obtenues expérimentalement avec les différents colorants. En comparant ces courbes avec celles des figures 6 et 7, on s'aperçoit qu'elles ont la même allure. On retrouve une relation linéaire entre C_o et F_T et entre C_o et C_t. En fonction de N, à C_o fixe, on retrouve une diminution progressive de C_t et une augmentation progressive de F qui tendent vers une limite. Nous en concluons que le modèle mis au point pour le BT peut être appliqué aux autres colorants PF, Py et AO.

Dans le cas de ces trois colorants, les limites pratiques de l'expérimentation ne permettent pourtant pas de déterminer les paramètres généraux du modèle, I et j, avec une précision suffisante : afin de déterminer j, et, par la suite I, il est nécessaire de mesurer C_E et F_E quand $C_E = C_s$. Or, les valeurs numériques de C_s sont très faibles, donc moins précises, dans le cas du Py ($C_s = 4$) et du AO ($C_s = 25$). D'autre part, le plateau entre les limites C_1 et c_2 est très court dans le cas du PF et du Py, et correspond à des valeurs de C_o très faibles, même quand N est grand (PF, Py et AO). Comme N peut être important à l'équilibre, les mesures de F deviennent imprécises, ses valeurs numériques étant faibles.

Pour toutes ces raisons, nous avons mesuré F et C_t non pas à l'équilibre, mais après 25 minutes, et nous en avons déduit N. Après avoir vérifié qu'une relation linéaire existe entre C_o et C_t d'une part et entre C_o et F d'autre part, nous

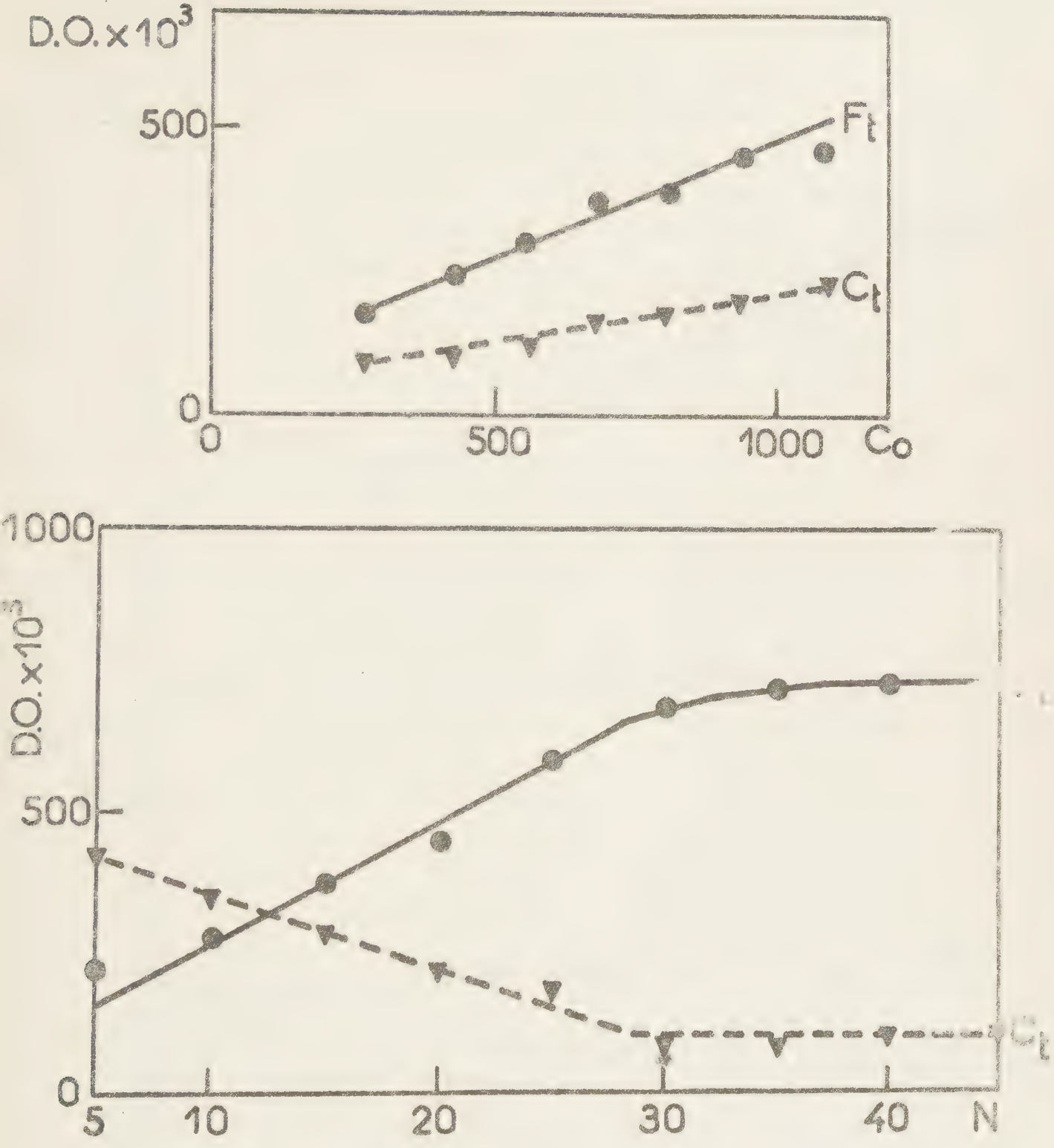


Figure 8. Haut : Concentration du colorant dans le milieu (-▼-) et dans les cellules (-●-) en fonction de sa concentrat' initiale. Bas : Concentration du colorant dans le mil' et dans les cellules en fonction de leur concentration.

a) PF, N = 19 10^5 cellules/ml C_o = 840 10^{-3} D.O , 30 min. d'incub.

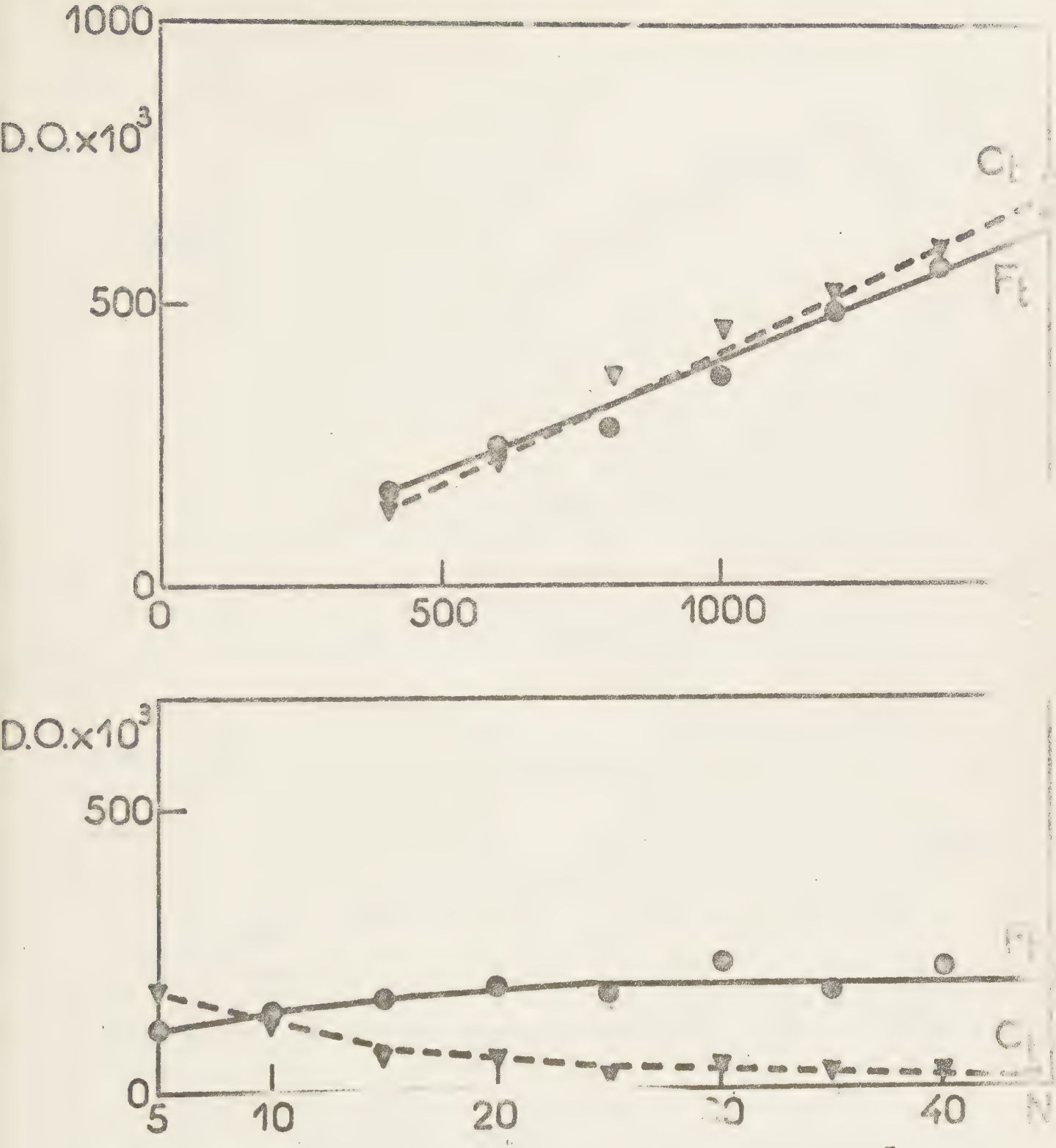


Figure 8 b. PY, N = 20 10^5 cell[illegible] - 610 10^{-3} D.O
30 min. d'incub.

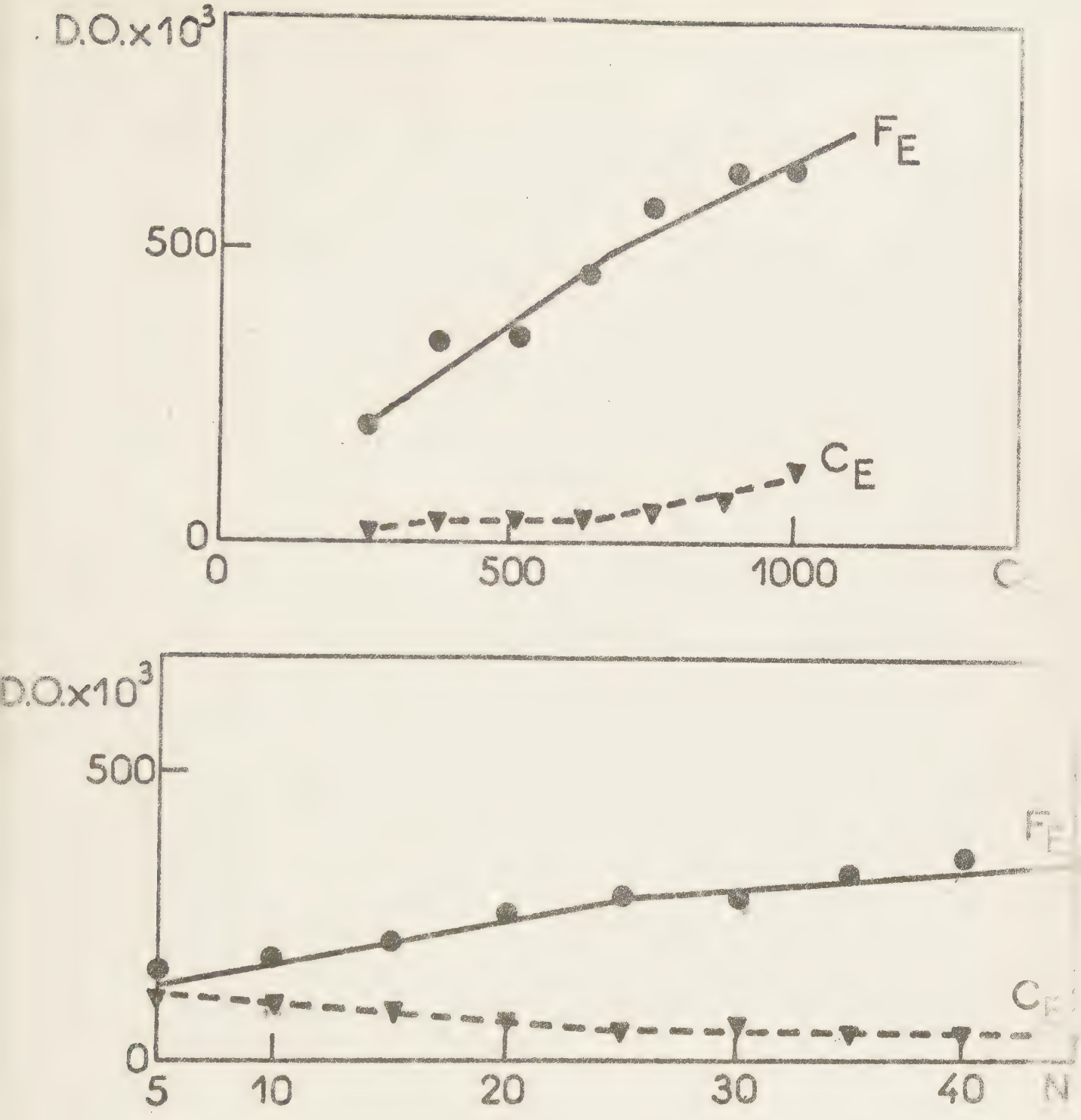


Figure 8 c. AO, N + 20 10^5 cellules/ml O_2 = 410 10^{-3} D.O incubation jusqu'à l'équilibre (cellules d'ascite de Krebs).

avons déterminé les valeurs de F, C_t et N pour un C_o fixe. De cette façon, il a été possible de comparer BT, PF et AO, puis AO et Py.

Nous avons résumé les résultats de ces expériences dans le tableau 2. On constate alors en comparant les valeurs de F pour chaque expérience, que les quantités de BT et de AO fixées sont plus grandes que celles de Py et de PF. Les quantités de BT et de AO fixées sont sensiblement les mêmes, tandis que celle de Py fixé est moindre que celle de PF.

F dépend toujours de C_t et de M : il sera d'autant plus grand que C_t et M seront plus petits. Quand on compare C_t et M dans les expériences d'absorption de BT et de AO par les cellules de Krebs, on voit que C_t est plus grand dans le cas de AO que dans le cas de BT, mais que, inversement, M est plus grand dans les cas du BT que dans celui du AO. Quand ces colorants sont absorbés par les cellules d'ascite de Zajdela, la distribution de C_t et de M est inverse : $C_t(BT) > C_t(AO)$, $M(AO) > M(BT)$. Moins de PF et de Py sont absorbés que de BT et d' AO : $C_t(PF)$ et $C_t(Py)$ sont plus grands que $C_t(BT)$ ou $C_t(AO)$; $M(PF)$ et $M(Py)$ sont plus grands que $M(AO)$ et $M(BT)$. Finalement, plus de PF est fixé que de Py. Dans le cas des cellules d'ascite de Krebs, cette différence provient de C_t : $C_t(Py)$ $C_t(PF)$. Dans le cas des cellules de Zajdela, une différence entre les M, $M(Py)$ étant plus grand que $M(PF)$, s'ajoute à la différence des C_t.

T A B L E A U 4

Exp.	Cellules Krebs	N	Colorant	C_o uM	F_{25}, uM	C_{25}, uM	M_{25}, uM	$\frac{C}{F}$	$\frac{M}{F}$
Type 2 n° 1	Ascite de Krebs	10	BT	150	56	56	38	1,00	0,67
			PF	"	34	85	31	1,57	0,91
			AO	"	55	75	20	1,36	0,36
Type 2 n° 2	Ascite de Krebs	20	BT	150	128	10	12	0,07	0,09
			PF	"	69	51	30	0,30	0,43
			AO	"	117	13	20	0,11	0,17
Type 2 n° 3	Ascite de Krebs	19	BT	150	91	9	50	0,98	0,54
			PF	"	79	32	39	0,40	0,49
			AO	"	102	41	7	0,40	0,06
			AO	400	220	39	141	0,17	0,64
			Py	"	162	131	107	0,80	0,66
Type 2 n° 4	Ascite de Zajdela	14	BT	150	113	12	215	0,10	0,13
			PF	"	71	59	20	0,83	0,28
			AO	"	103	9	38	0,36	0,36
			AO	400	286	14	100	0,48	0,34
			Py	"	140	181	79	1,29	0,56

INTERPRETATION DES RESULTATS

Quand on regarde les cellules au microscope, on voit, d'après leur couleur, que le colorant est fixé en 2 complexes. Les résultats obtenus avec des populations de cellules en suspension renforcent cette impression, et de plus, montrent que les sites du complexe 1 et du complexe 2 ne sont pas occupés indépendamment les uns des autres. Une certaine quantité, variable selon la nature du colorant, doit être fixée en complexe 2 avant que les sites du complexe 1 ne deviennent accessibles. Une fois ce seuil franchi, le colorant supplémentaire est fixé d'abord en complexe 1 jusqu'à ce que la limite soit atteinte, ensuite en complexe 1 et en complexe 2. La fixation est alors fonction du nombre de sites disponibles.

La quantité de colorant nécessaire à la saturation de ce seuil diffère selon le colorant. Elle est nettement plus grande dans le cas des colorants coopératifs qui forment plus facilement le 2ème complexe (BT et AO) que dans le cas des colorants non coopératifs, (PF et Py). Pour un colorant donné, cette quantité ne diffère pas d'un lot de cellules à l'autre et ne semble pas spécifique d'une espèce cellulaire donnée. Par contre, elle augmente quand on centrifuge les cellules qui contiennent déjà le colorant. Ceci amène à penser que les sites du complexe 2 préférentiellement occupés, et qui constituent le seuil, sont associés à la membrane. On sait, d'autre part, que les polysulfates ont une affinité 10 fois plus grande que les polyphosphates et 100 fois plus grande que des poly-alcools (43) pour les colorants fixés en complexe 2. On peut imaginer que les sites occupés préférentiellement correspondent aux polysulfates, soit aux mucopolysaccharides qui sont effectivement abondants dans la membrane cellulaire.

La saturation de tous les sites et, par conséquent,

le nombre de sites disponibles par cellule ne peut être déterminé expérimentalement ; des cellules s'agglomèrent avant que l'absorption soit terminée. Or, nous savons que l'absorption n'est pas la même pour toutes les cellules. On s'attendrait donc à la saturation de certaines d'entre elles quand d'autres commencent seulement à absorber le colorant. On peut penser que les cellules agglomérées correspondent à des cellules saturées, et il est tentant de voir une relation entre la saturation de la cellule et sa mort.

Les cellules vivantes sont capables de détruire le colorant. Cette propriété est probablement dûe à leur équipement enzymatique, et l'activité se situera au niveau du cytoplasme. Les résultats obtenus avec des cellules en suspension confirment ce raisonnement : des variations de l'ordre de grandeur que nous avons observé entre différents lots de cellules (tableau 3) sont d'un ordre de grandeur courant en enzymologie. La quantité de colorant détruite paraît dépendre de la quantité absorbée et de la quantité déjà détruite, pusiqu'elle augmente quand la concentration du colorant dans le milieu augmente et diminue quand la concentration des cellules augmente. Afin de confirmer définitivement cette hypothèse, un dosage direct des quantités de colorant détruit dans le milieu et dans les cellules serait nécessaire.

Il n'est pas possible actuellement d'interpréter la différence de métabolisme entre les deux souches cellulaires et entre les 4 colorants. Trop de facteurs peuvent intervenir, tels que la quantité des enzymes responsables, leur localisation par rapport à celle du colorant fixé et l'accessibilité du colorant qui dépendra de son mode de fixation.

Néanmoins, nous avons pu mettre en évidence un phénomène qui jusqu'ici était passé inaperçu. Les cellules sont capables de métaboliser le colorant, et de ce fait, règlent

RESULTATS

Après centrifugation, les tubes de gradient présentent l'image que nous reproduisons dans la figure 9. On observe 5 fractions, qui diffèrent par l'intensité de la coloration, et, dans le cas du BT et de l' AO par leur teinte. La fraction 1 est intensemment colorée, elle est orange dans le cas de l' AO, et violette dans le cas du BT. La fraction 2 est faiblement colorée, elle est bleu-verte dans le cas du BT, verte dans le cas de l' AO. La 3ème fraction est intensément colorée, elle est violette dans le cas du BT, orange dans le cas de l' AO, la 4ème fraction est intensément colorée, elle est bleue dans le cas du BT et orange dans le cas de l' AO. La 5ème fraction est intensément colorée sauf dans le cas de la Py. Elle est bleu-verte dans le cas du BT, verte dans le cas de l' AO. Toutes les fractions sauf la 4ème sont bien délimitées.

Lorsqu'on examine séparément les différentes fractions, l'examen microscopique montre que la première fraction contient des débris de membranes cellulaires. La deuxième fraction contient des mitochondries, des microsomes et des particules non identifiables. La 3ème fraction est très hétérogène ; elle contient des cellules entières, des agglomérats de mitochondries dans des membranes, des vésicules de potocytose, des microsomes et des noyaux retenant une partie du cytoplasme. La 4ème fraction contient surtout des cellules entières et des noyaux retenant une partie du cytoplasme. La dernière fraction contient des noyaux et surtout des agglomérats de cellules entières.

Quand on détermine quantitativement la concentration des cellules et des macromolécules, on obtient les chiffres résumés dans les tableaux 5 et 6.

Figure 9. Gradients de fractionnement de cellules d'ascite de Zajdela.

T A B L E A U 5

Distribution des macromolécules et du colorant dans les fractions (exprimé en %)

Fraction	I	II	III	IV	V
DNA (1)	1,9	2,7	56,7	25,8	12,2
RNA (1)	3,9	8,8	40,5	28,4	18,2
Protéines (1)	6,0	5,6	45,9	28,8	18,2
Macromolécules (1)	5,9	5,1	47,7	27,5	14,2
BT	5,9	5,4	63,2	17,4	7,5
PF	2,0	1,8	48,4	26,5	21,4
Py	1,2	2,8	73,8	16,3	6,3
DNA (2)	0,8	3,6	36,1	59,4	(0)
RNA (2)	2,0	4,7	79,2	12,8	(0,9)
Protéines (2)	10,0	5,4	74,2	8,9	(1,1)
Macromolécules (2)	9,7	5,4	72,1	11,4	(1,1)
AO	3,5	6,3	67,7	17,7	(4,6)

T A B L E A U 6

Distribution spécifique des macromolécules et du colorant

Fraction	I	II	III	IV	V
% DNA/% MM (1)	0,32	0,52	1,19	0,93	0,85
% RNA/% MM (1)	0,66	1,72	0,85	1,03	1,28
% BT/% MM	1,00	1,05	1,33	0,63	0,52
% PF/% MM	0,33	0,35	1,02	0,96	1,50
% Py/% MM	0,20	0,54	1,56	0,59	0,44
% DNA/% MM (2)	0,08	0,66	0,50	5,21	
% RNA/% MM (2)	0,20	0,87	1,09	1,12	
% AO/% MM	0,36	1,16	0,93	1,55	

On voit que la distribution des colorants suit approximativement celle des macromolécules. Toutefois, on constate certains écarts. La plupart des macromolécules cellulaires sont constituées par les protéines. Quand on compare les poids secs des macromolécules, on constate qu'une cellule contient 100 à 300 fois plus de protéines que d'acides nucléiques (113). Une faible fixation des colorants par les protéines suffira donc pour masquer une fixation relativement beaucoup plus importante par les acides nucléiques.

Les données portées dans le tableau 6 démontrent une correspondance entre l'aspect morphologique et la constitution chimique des fractions. La fraction 1, essentiellement composée de membranes, est pauvre en acides nucléiques. La fraction 2, contient surtout des mitochondries et des microsomes, elle est riche en RNA, pauvre en DNA. La fraction 3 du premier lot de cellules est particulièrement riche en DNA, comme l'est la fraction 4 du 2ème lot de cellules. Les protéines constituent, dans chaque fraction, la presque totalité des macromolécules. Par conséquent, il n'est pas possible de déterminer la teneur spécifique en protéines de chaque fraction.

Les différents colorants ne semblent pas avoir la même affinité pour les différentes fractions. On observe que relativement plus de BT est fixé dans les fractions légères, et que la fraction 3 est particulièrement riche en ce colorant. Le PF est surtout fixé par les fractions lourdes, en particulier, par la fraction 4. La Py se trouve surtout dans la fraction 3, les autres fractions sont relativement pauvres en ce colorant. L' AO se trouve surtout dans la fraction 4. On notera que la fraction riche en DNA fixe relativement beaucoup de BT, Py et AO.

ERREUR EXPERIMENTALE

Nous avons déterminé l'erreur expérimentale en comparant les résultats de 3 expériences simultanées (tableau 4).

TABLEAU 4

Fractions	Variations des pourcentages (3 expériences)				
	I	II	III	IV	V
DNA	± 1	± 1	± 2	± 2	± 1
RNA	± 0,5	± 0,3	± 2	± 2	± 0,5
Protéines	± 1	± 1	± 5	± 5	± 1
Macromolécules	± 0,5	± 0,5	± 0,5	± 0,5	± 0,5
BT PF Py AO	1	1	1	1	1

Quand les cellules provenaient du même lot, l'erreur correspondait à la précision des mesures. Quand les cellules provenaient de différents lots, les variations étaient importantes.

Dans le calcul des rapports, nous avons, par conséquent, utilisé la moyenne des pourcentages des macromolécules dans le cas des expériences portant sur le BT, le Py et le PF ; les cellules provenant du même lot. Dans le cas des expériences portant sur l' AO, un autre lot de cellules ayant servi, des

rapports ont été calculés à partir des pourcentages correspondants de macromolécules.

C O N C L U S I O N

L'étude des complexes formés entre les macromolécules d'origine biologique et les colorants basiques revêt un double intérêt et peut être envisagé sous deux aspects.

1) Les complexes formés in vitro peuvent être étudiés par des méthodes physico-chimiques qui permettent d'obtenir des renseignements concernant leur stoechiométrie, leur caractéristique thermodynamique etc.....au niveau des molécules. Les données ainsi obtenues peuvent, d'une part, répondre à certaines questions concernant la structure des macromolécules et, d'autre part, fournir des explications de l'action des colorants in vivo.

Les réactions du DNA avec les macromolécules ont été le plus étudiées. Celles du RNA et des protéines, matériel hétérogène, l'ont été beaucoup moins.

2) Des complexes de même nature ont été observés in vivo par histospectrophotométrie. Mais dans ce cas, une étude quantitative par des méthodes physicochimiques est impossible. Les conséquences de la formation des complexes, le dérèglement des fonctions des macromolécules, peut être étudié par des méthodes biologiques. Les données ainsi acquises permettent de répondre à certaines questions concernant la fonction des macromolécules.

En comparant les résultats des études physico-chimiques et biologiques, il est possible d'émettre des hypothèses sur le mécanisme d'action des colorants basiques in vivo. Ces

hypothèses ne peuvent pourtant pas être vérifiées tant qu'on ne dispose pas de connaissances précises sur la nature et la quantité des complexes formés in vivo.

Notre travail a été orienté par ces considérations. Il comporte deux parties, dont la première traite essentiellement du RNA.

1ère Partie

Etude physico-chimique du complexe 1 formé entre le RNA ribosomal et les colorants basiques Proflavine, Pyronine, Bleu de Toluidine et Acridine-orange, réputés mutagènes. Ce complexe était peu connu jusqu'à présent. Nous l'avons analysé en déterminant les paramètres thermodynamiques de la réaction entre le RNA et ces colorants.

a) nous avons déterminé le nombre de sites d'adsorption qui défini la stoechiométrie de la réaction, et ceci en fonction de la force ionique, du pH, de la nature des cations, et de la composition en bases du polynucléotide, (dans certains cas, nous avons utilisé le poly-A + poly-U et le poly-I + poly-C au lieu de RNA), la constante d'association et l'énergie libre correspondant à chaque colorant.

b) nous avons étudié l'influence de la température sur la désorption de 2 des colorants (PF et AO) fixés en complexe 1 sur le RNA et les polynucléotides de synthèse.

Les résultats obtenus mettent en évidence 2 groupes de sites à l'interieur du premier complexe. Le premier groupe de sites a pu être identifié comme sites d'intercalation entre les plateaux des bases, comme ils ont été proposés par LERMAN.

On observe une stabilisation des zones en double hélice analogue à celle qui a déjà été décrite pour le DNA par CHAMBRON. La détorsion provoquée par les molécules de colorant fixé sur ces sites provoquent dans le cas du RNA et des polynucléotides une désorganisation de la structure au voisinage de ces sites, ce qui permet la fixation subséquente d'autres molécules de colorant en complexe 1, avec une constante d'association plus petite. Ce deuxième groupe des sites peut correspondre à un mode de fixation récemment proposé par EACOKE et coll.

Nous en concluons que la structure secondaire et par conséquent la configuration du RNA et des homopolymères de synthèse est profondément perturbée par l'insertion de quelques molécules de colorant (4 - 5 suffisent pour 50 paires de bases).

2ème partie

Notre but était de rechercher les complexes acides nucléiques-colorant dans la cellule vivante, afin de déterminer leur action. Pour aborder ce problème, nous avons étudié le mode de fixation des colorants basiques dans les cellules.

Nous avons déterminé la quantité totale de colorant fixé par une population de cellules en fonction de la concentration du colorant et des cellules, au cours d'une incubation assurant la survie des cellules. Au cours de l'incubation, nous avons étudié l'aspect des cellules au microscope. Ensuite, nous avons étudié la distribution intracellulaire des colorants.

Nous avons pu observer deux faits jusqu'alors passés inaperçus.

a) l'occupation des sites du complexe 1 et du complexe 2 est interdépendante.

b) les cellules vivantes sont capables de détruire une partie du colorant absorbé. A partir de ces observations, il a été possible de mettre au point un modèle qui tient compte de tous les faits expérimentaux :
Après un certain temps d'incubation, et pour une concentration donnée de colorant et de cellules, un équilibre s'établit, d'une part entre le colorant libre dans le milieu, et le colorant fixé surtout en complexe 2 dans le cytoplasme, d'autre part, entre ce colorant et le colorant fixé surtout en complexe 1 dans le noyau. Un équilibre s'établit également entre les produits de dégradation des colorants dans le milieu et des mêmes produits intracellulaires. A chacun de ces équilibres correspond, bien entendu, une constante d'équilibre.
Les facteurs qui déterminent cet équilibre sont :

1) la concentration du colorant par rapport à la concentration des cellules. La cellule absorbe d'autant plus de colorant que le rapport colorant/cellules est grand.

2) la résistance des cellules à la pénétration des colorants.

3) la capacité des cellules de détruire le colorant à partir des complexes. Cette capacité est d'autant plus grande que plus de colorant se trouve dans le cytoplasme, donc fixé surtout en complexe 2. Une faible quantité de colorant est pourtant détruite à partir du complexe 1. La quantité de colorant détruite dépend de cette capacité, de la quantité de colorant fixé et de la quantité de colorant déjà détruite.

4) le nombre de certains sites saturés préférentiellement. Ces sites correspondent à des sites de complexe 2, et tout autre site n'est occupé qu'après leur saturation.

Par le jeu de ces différents facteurs, il est possible d'obtenir des cellules qui contiennent presque exclusivement du colorant fixé en complexe 2 dans le cytoplasme ou bien des cellules qui contiennent surtout du colorant fixé en complexe 1 dans le "noyau".

Des complexes sont d'autres part formés non seulement avec les acides nucléiques, mais avec d'autres constituants cellulaires, notamment les proteines et les mucopolysaccharides.

Sur le plan biologique on peut alors s'attendre à des actions très différentes selon le mode de fixation des colorants. Seul le colorant fixé en complexe 1 dans le noyau peut être responsable de mutations du type délétion et insertion comme il a été proposé par LERMAN. Des perturbations de cette nature seront probables quand la plus grande partie du colorant sera fixé dans le noyau. Le colorant fixé sur le RNA en complexe 1 provoque, comme nous l'avons montré dans la première partie de ce travail, des perturbations importantes de la configuration du RNA. On peut penser que ces perturbations entrainent des dérèglements importants dans la fonction du RNA. Les complexes formés avec les protéines peuvent être à l'origine d'un bloquage d'enzyme réparateur tel qu'il a été proposé par SETLOV.

Ces actions très complexes ont été étudiées par de nombreux auteurs. Mais les résultats divergent, et il serait nécessaire dans une étude ultérieure de déterminer la quantité exacte des différents complexes dans les cellules et de caractériser les macromolécules qui leur servent de support.

BIBLIOGRAPHIE

1) LISON, C., MUTSAARS, W.,
Qvart. J. Microsc. Sci., 91, 309 (1950).

2) ORGEL, A., BRENNER, S.,
J. Mol. Biology, 3, 762 (1961).

3) CRICK, F.H.C., BARNETT, L., BRENNER, S., WATTS ROBIN, R.J.,
Nature, 192, 1127 (1961).

4) NEBB, R.B., KUBITSCHEK, H.E.,
B.B.R.C., 13, 90 (1963).

5) MAGNI, G.E., VON BORSTEL, R.C., SORA, S.,
Mutation res., 1, 227 (1964).

6) Symposium on Mutagenesis.

7) HURWITZ, J., FURTH, J.J., MALAMY, M., ALEXANDER, M.,
Proc. Nat. Acad. os Sci., 48, 1222 (1962).

8) FREIFELDER, D., DAVISON, P.F., GEIDUSCHEK, E.P.,
Biophys.J., 1, 389 (1961).

9) MAGNI, G., SAEKI, T.,
Genetic Res., 5, 158 (1964).

10) RITCHIE, P.A.,
Genetic Res., 5, 168 (1964).

11) WALLIS, C., MELNICK, J.L.,
Virology, 23, 520 (1964).

12) BELLIN, J.S., YANKUS, C.A.,
B.B.A., 112, 363 (1966).

13) SASTRY, K.S., GORDON, M.P.,
B.B.A., 129, 32 (1966).

14) PEACOCKE, A.R., SKERRETT, J.N.H.,
Trans. Far. Soc., 52, 261 (1956).

15) LERMAN, L.S.,
Proc. Nat. Acad. Sci., 49, 94 (1963).

16) TUBBS, R.V., DITMARS, W.E., Van WINKLE, O.,
J. Mol. Biol., 9, 545 (1964).

17) GERSCH, N.F., JORDAN, D.O.,
J. Mol. Biol., 13, 138 (1965).

18) DRUMMOND, D.S., SIMPSON-GILDEMEISTER, V.F.W., PEACOCKE, A.R.
Biopolymers, 3, 135 (1965).

19) PRTTCHARD, N.J., BLAKE, A., PEACOCKE, A.R.,
Nature, 212, 1360 (1966).

20) RIVA, S.C.,
B.B.R.C., 23, 606 (1966).

21) DRUMMOND, D.S., PRITCHARD, N.J., SIMPSON-GILDEMEISTER,
V.F.W., PEACOCKE, A.R.,
Biopolymers, 4, 971 (1966).

22) CHAMBRON, J., DAUNE, M., SADRON, C.,
B.B.A., 123, 306 (1966).

23) BRADLEY, D.F., FELSENFELD, G.,
Nature, 184, 1920 (1959).

24) STONE, A.L., BRADLEY, D.F.,
J. of Am. Chem. Soc., (1961).

25) BRADLEY, D.F., WOLF, M.K.,
Proc. Nat. Ac. of Sci., 45, 944 (1959).

26) SASTRY, K.S., GORDON, M.P.,
B.B.A., 91, 406 (1964).

27) SCHOLTISSEK, C., BECHT, H.,
B.B.A., 123, 585 (1966).

28) SEMMEL, M., HUPPERT, J.,
J. Arch. Bioch. and Biophys., 108, 158 (1964).

29) BARBER, R., NOALE, M.,
B.B.A., 123, 205 (1966).

30) BOEDTKER, H.,
J. Mol. Biol., 2, 171 (1960).

31) CHAMBRON, J.,
Thèse Strasbourg, 1965.

32) HUPPERT, J., SEMMEL, M.,
B.B.A., 108, 500 (1964).

33) FELSENFELD, G., RICH, A.,
B.B.A., 26, 457 (1957).

34) COLOWICZ, C., KAPLAN, J.,
J. Enzymology, 1, 138 (1955).

35) OSTER, G., GRIMMSON, H.,
Arch. Biochim. Biophys., 24, 119 (1949).

36) WARING, M.J.,
J. Mol. Biol., 13, 269 (1960).

37) RAMSTEIN, J.,
Thèse Strasbourg, 1966.

38) LYONS, J.W., KOTIN, L.,
J. of Am. Chem. Soc., 87, 1670 (1965).

39) MAUSS, Y., CHAMBRON, J., DAUNE, M., BENOIT, H.,
à paraître.

40) LYONS, J.W., KOTIN, L.,
J. Am. Chem. Soc., 87, 1781 (1965).

41) KLOTZ, I.M.,
The Proteins, vol. I. B., 727 Ac. Press., N.Y., (1953).

42) LE PECQ,
Thèse Paris, 1965.

43) MICHAELIS.,
Cold Spring Harbor Symposium of Quant. Biol., 131, (1947).

44) WOLF, K.M., ANONSON, N.S.,
J. Histochem. Cytochem., 9, 22 (1964).

45) DULBECCO, R., VOGT, M.,
Virology, 5, 236 (1958).

46) SCHAFFER, F.L.,
Fed. Proc., 19, 405 (1960).

47) WELSH, J.N., ADAMS, M.H.,
J. Bacteriology, 68, 122 (1954).

48) FREESE, E.,
Proc. Nat. Acad. Sci., 46, 622 (1959).

49) BRENNER, S., BARNETT, L., CRICK, F.H.C.,
J. Mol. Biol., 3, 121 (1961).

50) PERDREAU, J.R., TODD, C.,
Proc. Roy. Soc., London, série B, 112-277 (1933).

51) DRAKE, J.W.,
J. Coll. Comp. Phys., supplément 1, 19 (1964).

52) EPHRUSSI, E., HOTTINGER, R.,
Nature, 166, 956 (1930).

53) KIELMAN, B.A.,
Exp. Cell. Res., 31, 275 (1963).

54) NAGAI, S.,
Exp. Cell. Res., 17, 590 (1959).

55) WEBB, R.B., KUBITSCHEK, H.E.,
B.B.R.C., 13, 2 (1963).

56) ROSE?BLUM, R.B., HOSEWITH, B., KRAMER, S.D.,
Proc. Sec. Exp. Biol. Med., 37, 166 (1937).

57) THOMPSON, R.L.,
J. Imm., 22, 519 (1967).

58) OSTER, G., MAC LAREN, A.D.,
J. Gen. Phys., 33, 213 (1950).

59) ARDITTI, R.R., COPPO, A.,
Virology, 25, 643 (1965).

60) EATON, M.D., CHEEVER, F.S., LEVENSON, C.G.,
J. Imm., 66, 463 (1951).

61) FRANKLIN, R.M.,
Virology, 6, 625 (1958).

62) HIATT, C.W.,
Trans. N.Y. Ac. Sc., 24, 64 (1960).

63) HIATT, C.W., KAUFMAN, E., HELPRIN, J.L., BARON, S.,
J. Imm., 84, 480 (1960).

64) LEDINKO, N.,
Virology, 8, 536 (1959).

65) OPTON, E.M., GREEN, R.H.,
Fed. Proc., 19, 408 (1960).

66) CUTCHINS, E.C., DAYHUFF, T., WARREN,
J. Bact. Proc. (Soc. Am. Bact.) 61, 160 (1961).

67) CUTCHINS, E.C., DAYHUFF, T.,
Virology, 17, 420 (1962).

68) GROWTHLER, D., MELNICK, J.L.,
Virology, 14, 11 (1961).

69) WILSON, J.N., COOPER, P.D.,
Virology, 26, 1 (1965).

70) WILSON, J.N., COOPER, P.D.,
Virology, 17, 195 (1962).

71) HACKETT, A.J.,
Photochem. Photobiol., 1, 147 (1962).

72) WILCOX, N.C., GINSBERG, H.S.,
J. Bact., 84, 526 (1962).

73) SCHAFFER, F.L.,
Virology, 18, 412 (1962).

74) SCHAFFER, F.L., HACKETT, A.J.,
Virology, 21, 124 (1963).

75) SCHAFFER, F.L.,
Fed. Proc., 19, 405 (1960).

76) WALLIS, C., MELNICK, J.L., SAKUDARA, N.,
J. Imm., 91, 677 (1963).

77) WALLIS, C., MELNICK, J.L.,
Virology, 21, 332 (1963).

78) WALLIS, C., MELNICK, J.L.,
Virology, 23, 520 (1964).

79) TOMITA, Y., PRINCE, A.M.,
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 112, 887 (1963).

80) SCHOLTISSEK, C., ROTT, R.,
Nature, 204, 39 (1964).

81) SCHOLTISSEK, C.,
B.B.A., 103, 146 (1965).

82) CLIFTON, C.E., LAMLER, T.G.,
Proc. Soc.Exp. Biol. Med., 27, 1041 (1930).

83) SCHULTZ, E.W., KRUEGER, A.P.,
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 26, 100 (1928).

84) BURNET, F.M.,
J. Path. Bact., 37, 179 (1933).

85) FOSTER, R.A.C.,
J. Bact., 56, 795 (1948).

86) DE MARS, R.I.,
Virology, 1, 83 (1955).

87) KELLENBERGER, E., SECHAUD, J.,
Virology, 3, 256 (1957).

88) YAMOTO, N.,
J. Bact., 75, 118 (1958).

89) UCHIDA, J.,
J. Exp. Med., 28, 67 (1958).

90) MURAKAMI, W.F., VAN VUNAKIS, H., LEVINE, L.,
Virology, 9, 624 (1959).

91) HIROTA, Y., IJIMA, T.,
Nature, 180, 655 (1957).

92) BASES, R., GRESLAND, L.,
Virology, 29, 499 (1966).

93) FEINER, R.R., HILL, R.F.,
Nature, 49, 291 (1963).

94) SETLOV, R.B.,
J. Cell. Comp. Phys. Supplément 1, 51 (1964).

95) MANSON, L.A.,
Fed. Proc., 13, 503 (1954).

96) SOFFER, R.L., GROS, F.,
B.B.A., 87, 423 (1964).

97) LASNITZKY, I., WILKINSON, J.H.,
Brit. J. Cancer, 2, 369 (1948).

98) JACOBY, F., MEDAWAR, P.B., WILLMER, E.N.,
Brit. Med. J., 11, 149 (1941).

99) BRIODY, B.A., STANNARD, C.,
J. Imm., 67, 423 (1951).

100) DEDINKO, N.,
Virology, 6, 512 (1958).

101) GREEN, R.H., OPTON, E.M.,
Proc. Soc. Exp. Med., 102, 519 (1959).

102) LERMAN, C.S.,
J. Cell. Comp. Phys. Supplément 1, 64 (1964).

103) LERMAN, C.S.,
J. Cell. Comp. Phys. Supplément 1, 51 (1964).

104) WOSCPCKI, J.B., BUNTING, H.A.M.,
J. Anat., 1, 81 (1947).

105) HAREL, L., BLADE, E., BLAT, C.,
C.R. Acad. Sc., 263, 679 (1966).

106) DULBECCO, R., VOGT, M.,
J. Exp. Med., 99, 167 (1954).

107) EARLE, W.R., SCHILLING, E.C.,
J. Nat. Canc. Inst., 4, 165 (1943).

108) CHAUVEAU, J.,
Rev. Franc. et Clin. Biol., 3, 503 (1958).

109) BURTON, K.,
Biochem. J., 62 (1956).

110) BARUN, C.S., NASH, C.W., JENNINGS, E., NYGAARD, O., WEIGAND, H.,
Arch. Biochem., 25, 375 (1950).

111) ZALTA, J.P.,
Thèse Paris, 1961.

112) KABAR, E.A., MAYER, M.M.,
Exper. Immunochem. Springfield Ch. 22 (1948).

113) ZAJDELLA, F.,
Communication personnelle

114) CHARGAFF, E., DAVIDSON, J.N.,
The Nucleic Acids, 1955, Ac. Press. N.Y.